

**DISEÑO DE EXPERIMENTOS PARA LA ABUNDANCIA DE MICROPLÁSTICOS
CON RESPECTO A LAS TEMPORADAS Y EL HÁBITAT EN EL CARIBE
COLOMBIANO**

Jenny Alejandra Ruiz Jiménez

Trabajo de Grado para optar al título de Especialista en Estadística

Director

Andrés Sebastián Ríos Gutiérrez

Candidato a Doctor en Estadística

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Ciencias Básicas

Escuela de Matemáticas

Especialización en estadística

Bucaramanga

2024

Dedicatoria

Dedicado a mi familia

*Porque recordar es más que tener a alguien presente en la memoria,
significa “volver a pasar por el corazón”.*

Agradecimientos

Agradezco al proyecto 2839 titulado “Evaluación de la contaminación por microplásticos (MPs) sobre la comunidad de zooplancton en el Parque Nacional Natural Corales de Profundidad (PNNCPR) y en el Parque Nacional Natural Corales del Rosario y de San Bernardo (PNNCRSB)” de la Vicerrectoría de Investigación y Extensión (VIE) de la Universidad Industrial de Santander (UIS), bajo la dirección del profesor Rafael Cabanzo Hernández. También agradezco a la profesora María Isabel Criales de la Universidad Nacional de Colombia, así como al personal de Parques Nacionales Naturales Corales del Rosario y San Bernardo, y Corales de Profundidad, por permitirme utilizar los datos necesarios para la realización de este trabajo de grado.

Extiendo mi gratitud a la profesora Tulia Rivera por sus valiosas revisiones y sugerencias, las cuales contribuyeron a mejorar el contenido final del documento. Agradezco también al profesor Andrés Ríos por su paciencia y amabilidad en las correcciones, y a Claudia Garavito, secretaria de la escuela, por su disposición para resolver mis dudas y problemas administrativos con tanta amabilidad.

Deseo hacer un reconocimiento especial al profesor Jader Guerrero, de la Escuela de Física, por su sentido del humor, sus valiosos comentarios y correcciones, que enriquecieron este trabajo.

Agradezco a mis amigos de siempre (las Lauras, Dny, Angie, Yes, Fer, José, Yoja, Vancho, Migue), así como a mis nuevos amigos del PNN (Luly, Keyla, Omitar, el Tiri) y a mis amigos de la especialización (Laurita, Dieguito, Dumar, Jorge y la otra Laurita) por su apoyo y las risas compartidas.

Finalmente, y lo más importante, agradezco profundamente a mi familia, su constante ayuda y respaldo han sido fundamentales, sin importar la distancia o la complejidad de las situaciones. Además, quiero agradecer a Álvaro por impulsarme a realizar esta especialización.



Resumen

Título: Diseño de experimentos para la abundancia de microplásticos con respecto a las temporadas y el hábitat en el Caribe Colombiano¹.

Autores: Jenny Alejandra Ruiz-Jiménez²

Palabras clave: Áreas Marinas Protegidas, diseño cruzado-anidado, microplásticos, test de aleatorización.

Descripción:

El estudio analiza la abundancia de microplásticos (MPs) en un área Marina Protegida (AMP) del Caribe Colombiano. Se determinó si existían diferencias en la presencia de MPs con respecto al hábitat y con respecto a la temporada en algunas estaciones del AMP, considerando elementos adicionales como la posición de recolección (superficie y columna de agua). Se implementó un diseño experimental cruzado-anidado, que permitió realizar la comparación considerando la estructura jerárquica e interacciones entre los factores, debido a que algunas estaciones se encuentran anidadas al hábitat o ubicación del AMP. El diseño cruzado-anidado reveló diferencias significativas en la abundancia de MPs entre temporadas, así como una mayor abundancia en la columna de agua frente a la superficie. No obstante, uno de los desafíos al aplicar este modelo fue el cumplimiento de los supuestos de normalidad y homogeneidad de los residuales. Debido a esto, se buscó un diseño alternativo para el análisis de datos no paramétricos. Se utilizó el test de aleatorización que consiste en la aleatorización y remuestreo de los datos, permitiendo evaluar la significancia sin depender de distribuciones específicas. Este método reforzó los resultados del diseño cruzado-anidado, confirmando la diferencia entre las medias de los factores evaluados. De esta forma, se confirma que, si existen diferencias en la abundancia de MPs entre las temporadas, con un incremento notable durante la temporada de lluvias, debido al aporte fluvial que genera el Canal del Dique en los hábitats costeros. Durante la temporada seca, el hábitat oceánico mostró un incremento en la abundancia de MPs, posiblemente por las corrientes marinas que transportan residuos desde el sur del Caribe colombiano y Panamá hacia esta AMP. La posición de los MPs en el agua afecta su abundancia, siendo mayor en la columna de agua que en la superficie, presentando mayor riesgo de ingesta de MPs por parte de organismos marinos.

¹Trabajo de grado

²Facultad de Ciencias. Escuela de Matemáticas. Especialización en Estadística. Director: Andrés Sebastián Ríos Gutiérrez. Candidato a Doctor en Estadística.

Abstract

Title: Experimental Design for Microplastic Abundance in Relation to Seasons and Habitat in the Colombian Caribbean ¹.

Author: Jenny Alejandra Ruiz-Jiménez²

Keywords: Crossed-nested design, Marine Protected Area, microplastics, randomization test.

Description:

This study analyzes the abundance of microplastics (MPs) in a Marine Protected Area (MPA) of the Colombian Caribbean. It was determined whether there were differences in the presence of MPs concerning habitat and season at various stations within the MPA, considering additional elements such as the position of collection (surface and water column). A crossed-nested experimental design was implemented, allowing for comparison while considering the hierarchical structure and interactions between factors, as some stations are nested within the habitat or location of the MPA. The crossed-nested design revealed significant differences in the abundance of MPs between seasons, as well as a higher abundance in the water column compared to the surface. However, one of the challenges in applying this model was meeting the assumptions of normality and homogeneity of residuals. Consequently, an alternative design for non-parametric data analysis was sought. The randomization test was employed, which involves randomizing and re-sampling the data, allowing for the evaluation of significance without relying on specific distributions. This method reinforced the results of the crossed-nested design, confirming differences between the means of the evaluated factors. Thus, it was confirmed that there are differences in the abundance of MPs between seasons, with a notable increase during the rainy season due to the fluvial input generated by the Canal del Dique in coastal habitats. During the dry season, the oceanic habitat showed an increase in the abundance of MPs, possibly due to ocean currents transporting waste from the southern Colombian Caribbean and Panama toward this MPA. The position of MPs in the water affects their abundance, being higher in the water column than at the surface, thus presenting a greater risk of ingestion by marine organisms.

¹Thesis

²Faculty of Sciences. School of Mathematics. Specialization in Statistics. Director: Andrés Sebastián Ríos Gutiérrez. Ph.D. Candidate in Statistics.

Tabla de Contenido

	Pág.
Introducción	10
1.Descripción del problema	12
2.Antecedentes	14
3.Objetivos	17
3.1.Objetivo General.....	17
3.2.Objetivos Específicos.....	17
4.Marco teórico	18
4.1.Diseño de Experimentos	18
4.2.Diseño Cruzado - Anidado.....	18
4.3.Modelo matemático	19
5.Metodología	25
5.1.Área de estudio	25
5.2.Recolección de muestras.....	27
5.3.Análisis de laboratorio	27
5.4.Análisis estadístico.....	28
6.Resultados	30
6.1.Análisis exploratorio de datos (EDA).....	30
6.2.Modelos de los diseños de experimentos.....	32
6.3.Comparación múltiple.....	34
6.4.Validación de los modelos.....	36
6.5.Aplicación de alternativa para datos no paramétricos	37
7.Discusión	40
8.Conclusiones.....	42
Referencias Bibliográficas	44
Anexos	49

Lista de tablas

Tabla 1. Descripción de variables	28
Tabla 2. Medidas de tendencia central de la abundancia de MPs/m ³ en función de la temporada, el hábitat y la posición de los microplásticos en el agua (agua superficial vs. columna de agua).30	
Tabla 3. Tabla Anova para el primer modelo. Df: Grados de libertad; Sum Sq: Suma de cuadrados; F: F de Fisher; PR(>F): Valor p; Signif: código de significancia 0 “***” 0.001 “**” 0.01 “*” 0.05 “.” 0.1 “ “ 1.	33
Tabla 4. Tabla Anova para el primer modelo. Df: Grados de libertad; Sum Sq: Suma de cuadrados; F: F de Fisher; PR(>F): Valor p; Signif: código de significancia 0 “***” 0.001 “**” 0.01 “*” 0.05 “.” 0.1 “ “ 1.	33
Tabla 5. Criterio de AIC de los modelos 1 y 2.	34
Tabla 6. Diferencias significativas entre la interacción Temporada-Hábitat del modelo 1.....	35
Tabla 7. Diferencias significativas entre la interacción Temporada-Hábitat, Temporada-Posición del modelo 2.....	35

Lista de figuras

Figura. 1 Esquema Cruzado-Anidado. Tomado de Marín, J.M. (2009)	19
Figura. 2. A) Mapa de las 12 estaciones de muestreo (diamantes rojos) en el hábitat costero (PNNCRSB) y el hábitat oceánico (PNN CPR). Mapa creado por Parques Nacionales Naturales y tomado de Ciales-Hernandez et al., <i>en prensa</i> . B) Redes utilizadas para el muestreo de microplásticos	26
Figura. 3 Diseño cruzado-anidado con factores temporada, hábitat y estaciones anidadas al hábitat. E: indica las estaciones	29
Figura. 4 Diseño Cruzado-anidado con factores temporada, hábitat y estaciones anidadas al hábitat y la posición de los microplásticos. E: indica las estaciones 1 a 12, S: indica que la muestra se recolectó de forma superficial (red manta); C: indica que la muestra se recolectó en la columna de agua (minibongo)	29
Figura. 5. Boxplot de la abundancia de MPs/m ³ en función de la temporada, el hábitat y la posición de los microplásticos en el agua (agua superficial vs. columna de agua).....	31
Figura. 6. Abundancia de MPs en las estaciones de las AMP	32
Figura. 7. Gráfico Q-Q plot para el modelo 2.....	36
Figura. 8. Gráfico de Residuales vs Ajustados para el modelo 2.	37
Figura. 9. Comparación de la abundancia de MPs según temporada, hábitat y posición del MPs en el agua.	39

Lista de anexos

Los archivos se encuentran adjuntos y se pueden consultar en el Repositorio Institucional

Anexo 1. Resultados de Tukey primer modelo.....	49
Anexo 2. Resultados de Tukey segundo modelo	51
Anexo 3. Código del test de aleatorización en lenguaje R.	53

Introducción

Los residuos plásticos representan un problema creciente de contaminación a nivel mundial, experimentando una rápida acumulación y expansión (Cole et al., 2011; Nihei et al., 2024). Este tipo de residuos se acumulan a un ritmo incontrolable y se propagan fácilmente a través del viento y los ríos llegando a los entornos marinos (Andrady, 2011; Wright et al., 2013). Las investigaciones recientes se han centrado en los microplásticos (MPs) que son partículas de plástico con dimensiones que oscilan entre 1 μm y 5 mm (Cole et al., 2011). Los MPs se pueden clasificar según su origen en primarios, los cuales son partículas plásticas fabricadas directamente por la industria, como exfoliantes o pellets; y secundarios, que se forman a partir de la degradación o fragmentación de los plásticos debido a la exposición a la radiación UV (fotooxidación), a los procesos mecánicos o a la degradación biológica (Cole et al., 2011).

La detección de MPs se ha documentado en diversos ecosistemas desde sedimentos (Garcés-Ordóñez et al., 2022; Miller et al., 2023) y masas de agua dulce en la atmósfera (Bhat, 2023; Carretero et al., 2021; Thacharodi et al., 2024). Además, se han evidenciado en entornos marinos tanto costeros (Garcés-Ordóñez et al., 2020) como oceánicas (Eriksen et al., 2018); abarcando diferentes estratos de la columna de agua (Di Mauro et al. 2017; Sun et al. 2018), e incluso en las Áreas Marinas Protegidas (AMP) (Nunes et al., 2023).

La presencia de MPs es motivo de preocupación debido a los efectos adversos que representan para los organismos marinos, ya que estas partículas pueden ser consumidas intencionalmente (He et al., 2022) o accidentalmente (de Sá et al., 2015) por diversos animales marinos. En los organismos se produce obstrucción intestinal, abrasión interna, inflamación e incluso la muerte de los consumidores primarios como el zooplancton (He et al., 2022),

extendiéndose a través de la red alimentaria hacia consumidores de niveles superiores como peces (Mcneish et al., 2018), tortugas (Duncan et al., 2018) y aves marinas (Reynolds y Ryan, 2018). Adicionalmente, los MPs son vectores que pueden liberar aditivos y pigmentos tóxicos de su composición (Khalid et al., 2021; Nunes et al., 2023) causando una gran amenaza a la biodiversidad marina.

Debido a la importancia de las AMP en la conservación de la biodiversidad marina y la preservación de los ecosistemas para el desarrollo sostenible (IUCN, 1980; Nunes et al., 2023), es importante cuantificar la contaminación por MPs para entender el riesgo y los factores que pueden intensificar su incremento. Por lo anterior, el presente estudio tiene como objetivo determinar si existen diferencias de la abundancia de MPs en el factor temporal y el factor espacial en dos AMP del Caribe Colombiano.

1. Descripción del problema

A nivel mundial se genera una gran cantidad de residuos plásticos de aproximadamente 350 millones de toneladas cada año (Ritchie et al., 2023). Este alto volumen, sumado a un deficiente manejo, ha ocasionado que cerca de 2 millones de toneladas terminen en los sistemas acuáticos anualmente (Ritchie et al., 2023; Thacharodi, Meenatchi, et al., 2024).

En Colombia, se produce aproximadamente 0.14 kg per cápita de residuos plásticos anuales (Jambeck et al., 2015). De esta cantidad, 431 toneladas llegan al mar (0,008 kg por persona) (Jambeck et al., 2015) desde los asentamientos humanos que se encuentran en las zonas costeras como Cartagena, Santa Marta, Buenaventura y Tumaco, así como los vertimientos de aguas residuales sin tratar depositadas directamente en el mar o a través de los ríos Magdalena y San Juan (Garcés-Ordóñez et al., 2021).

Una vez en el medio acuático, los residuos plásticos se fragmentan en partículas de distintos tamaños debido a procesos físicos, mecánicos o biológicos generando macroplásticos (> 20 mm), mesoplásticos (5-20 mm), microplásticos (< 5 mm) y nanoplásticos (<1 μm) (Ramkumar et al., 2022). Los MPs, por su pequeño tamaño y forma similar al alimento (He et al., 2022), son confundidos por numerosos organismos marinos como crustáceos (Timilsina et al., 2023), bivalvos (Khanjani et al., 2023), anfípodos (Iwalaye & Maldonado, 2024), copépodos (Iwalaye & Maldonado, 2024) corales (Lanctôt et al., 2020), peces (Lusher et al. 2013, Sá et al. 2015, Botterell et al. 2019) y representan un potencial peligro para la red trófica.

En el caso de los consumidores primarios como el zooplancton, se ha demostrado que la ingesta de MPs puede acumularse en el tracto digestivo (He et al., 2022). Esta bioacumulación induce daños mecánicos incrementando el ingreso de las partículas a los tejidos y células generando

efectos adversos a nivel fisiológicos y sistémicos como malnutrición, alteraciones en la expresión génica, disminución en la capacidad reproductiva y mayor tasa de la mortalidad poblacional (Cole et al., 2011; He et al., 2022).

La posibilidad de que los organismos acuáticos consuman MPs aumenta al ser colonizados por biofilms que los convierte en objetivos atractivos y palatables. Debido a lo anterior y a sus potenciales efectos ecotoxicológicos (Anbumani & Kakkar, 2018), es importante evaluar la distribución espacial y temporal de los MPs en ecosistemas biodiversos y estratégicos como áreas marinas protegidas (AMP). El Parque Nacional Natural Corales del Rosario y San Bernardo (PNNCRSB) y el Parque nacional Natural Corales de Profundidad (PNNCPR) que integran estas AMP, presentan una elevada presión antrópica debido al turismo recreativo y a su cercanía a centros poblacionales con malos sistemas de manejo de residuos sólidos (Garcés-Ordóñez et al., 2021); además, reciben aportes hídricos del canal del Dique, el cual drena aproximadamente 228 km³ de agua de origen continental (Arroyave et al., 2014) incrementando el riesgo de contaminación por MPs.

2. Antecedentes

La problemática de la contaminación por residuos plásticos y MPs es una amenaza creciente para los ecosistemas marinos a nivel mundial (Cole et al., 2011). En Colombia, se han llevado a cabo diversos estudios que abordan esta problemática, investigando la presencia de macroplásticos, mesoplásticos y MPs en sedimentos, agua marina superficial, y la ingestión por parte de peces en el Caribe y el Pacífico colombiano (Acosta-Coley y Olivero-Verbel, 2015; Garcés-Ordóñez et al., 2019; Acosta-Coley et al. 2019; Calderón et al., 2019). Los estudios han caracterizado el estado ambiental en diferentes regiones del país, en particular, las zonas norte y centro del Caribe colombiano, evidenciando una la calidad del paisaje deficiente, donde la mayoría de las playas presentan un estado de limpieza inaceptable y un estado ambiental de mediocre a insatisfactorio (Williams et al., 2016; Rangel-Buitrago et al., 2020).

En Santa Marta, los estudios se han centrado en el ecosistema de manglar, identificando la presencia de macroplásticos y MPs en la superficie del agua y la relación entre el aumento durante la temporada alta de turismo, tanto en el número de personas como en la contaminación por macrobasura, en comparación con la temporada baja de turismo (Garcés-Ordóñez et al., 2019; Garcés-Ordóñez y Bayona-Arenas, 2019; Garcés-Ordóñez et al., 2020). El estudio de Calderón et al. (2019) recalca que el 12,1% de los pescados comprados en un mercado local de la Ciénaga de Santa Marta contenían MPs, evidenciando la problemática de la contaminación por plásticos en la cadena alimentaria y potencial peligro para la salud humana.

En Cartagena, las investigaciones han revelado la presencia de MPs de origen primario y secundario en las playas, con forma de gránulos, fragmentos y filamentos (Acosta-Coley y Olivero-Verbel, 2015). Estos MPs muestran respuestas toxicológicas en *Caenorhabditis elegans*, comprobando la capacidad de los MPs para acumular y transportar elementos tóxicos (Acosta-

Coley et al., 2019). En los sistemas de arrecife de coral y manglar de la Isla Grande, se investigó la presencia de MPs y mesoplásticos en peces donde las especies que habitan en los manglares habían ingerido más MPs y mesoplásticos, en contraste con las especies de arrecifes de coral. Este hallazgo subraya la variabilidad en la exposición a la contaminación por plásticos en distintos ecosistemas marinos (Jimenez-Cardenas et al., 2022).

En el Área Marina Protegida (AMP) de Cispatá del Caribe colombiano evaluaron la contaminación por MPs en manglares y playas, encontrando una mayor abundancia de MPs en el agua de los manglares en comparación con las playas (Garcés-Ordóñez et al. (2022). Asimismo, evaluaron la incidencia de la ingestión de MPs por peces de ecosistemas de manglares, destacando que la mayoría de los MPs ingeridos eran filamentos (Garcés-Ordóñez et al., 2020).

En estudios que abarcan las dos zonas del Caribe y el Pacífico colombiano se encuentran las investigaciones de Garcés-Ordóñez et al., (2020) donde evaluaron la contaminación plástica en 43 playas, encontrando que las concentraciones mayores de MPs se encontraron en las playas de las ciudades del Caribe y en las zonas rurales de los municipios del Pacífico. Adicionalmente en Garcés-Ordóñez et al., (2021) determinaron la abundancia, distribución y características físicas y químicas de los MPs en aguas superficiales evidenciando como estas partículas ingresan a los sistemas acuáticos a través del manejo inadecuado de los desechos sólidos y las aguas residuales generadas por actividades socioeconómicas y domésticas.

En el Pacífico colombiano, se han identificado altos niveles de macrobasura en los bosques de manglares de Buenaventura, situándose esta zona como una de las áreas costeras más contaminadas a nivel mundial (Riascos et al., 2019). Asimismo, se han determinado diferencias temporales y espaciales en la densidad, distribución y tipo de MPs en los sedimentos de la Bahía de Buenaventura, encontrando una dominancia de filamentos y la mayor concentración de

contaminantes en los sistemas de estuario (Vásquez-Molano, Molina & Duque et al 2021). En los sedimentos y agua superficial de manglares se investigó la abundancia y características de la basura plástica durante las temporadas de lluvias y sequía en aguas de los estuarios de Saija y Timbiqui donde la temporada de altas precipitaciones presentó mayor abundancia en sedimentos y estuarios (Garcés-Ordóñez et al., 2023). Adicionalmente, se ha documentado la presencia de MPs en peces planctívoros a lo largo de la costa del Pacífico sureste, incluyendo Buenaventura (Ory et al., 2018).

3. Objetivos

3.1. Objetivo General

Determinar si existen diferencias en la presencia de microplásticos con respecto al hábitat y con respecto a la temporada en algunas estaciones de las Áreas Marinas Protegidas.

3.2. Objetivos Específicos

Realizar un análisis exploratorio de los datos de la abundancia de microplásticos con respecto a los factores de temporada y hábitat, en ambas Áreas Marinas Protegidas.

Evaluar un diseño de experimentos cruzado-anidado para determinar si existen diferencias en las abundancias de microplásticos con respecto a dos factores, la temporada y el hábitat.

Evaluar un diseño de experimentos cruzado-anidado implementando tres factores, la temporada, el hábitat y la posición del microplástico.

4. Marco teórico

4.1. *Diseño de Experimentos*

Es una técnica donde se diseña un conjunto de procedimientos experimentales para probar una hipótesis. Esto consiste en una serie de pruebas controladas donde se manipulan las variables independientes o factores de un proceso. De esta forma, es posible medir los efectos que causa cada cambio en las variables dependientes y determinar cuáles variables influyen realmente en los resultados finales (Izquierdo Ilzarbe et al., 2007; Montgomery, 2017).

4.2. *Diseño Cruzado - Anidado*

El diseño cruzado es cuando dos factores están completamente cruzados, lo que implica que todas las combinaciones posibles de los niveles de cada factor se presentan en el diseño, como se observa en un diseño bifactorial. Se dice que dos factores están cruzados cuando ninguno de ellos está subordinado al otro, es decir, ninguno de ellos está contenido en el otro ($A \subset B$) y viceversa ($B \subset A$). El enfoque diseño anidado o jerárquico es una metodología utilizada en experimentos multivariados en los cuales se presentan cuando los niveles de un factor (p. ej., el factor B) son similares, pero no idénticos para diferentes niveles de otro factor (p. ej., A). Este tipo de disposición se denomina diseño anidado o jerárquico, en el que los niveles del factor B están anidados bajo los niveles del factor A (Montgomery, 2017). Los diseños cruzado-anidados son caracterizados por la presencia tanto de factores cruzados como de factores anidados. Es importante resaltar que no existe un modelo matemático único para este tipo de diseño, ya que su formulación depende de la disposición específica de los factores en el diseño experimental. Un ejemplo realizado por Marín, J.M. (2009) sobre este tipo de diseños es: En una serie de establecimientos de una cadena de tiendas de ropa se contabilizan las ventas realizadas de ropa de verano y de ropa de invierno. Se anotan, además los empleados que realizan las ventas.

Hay tres factores:

A ≡ Tienda

B ≡ Tipo de ropa (verano, invierno)

C ≡ Empleado

El esquema es el siguiente

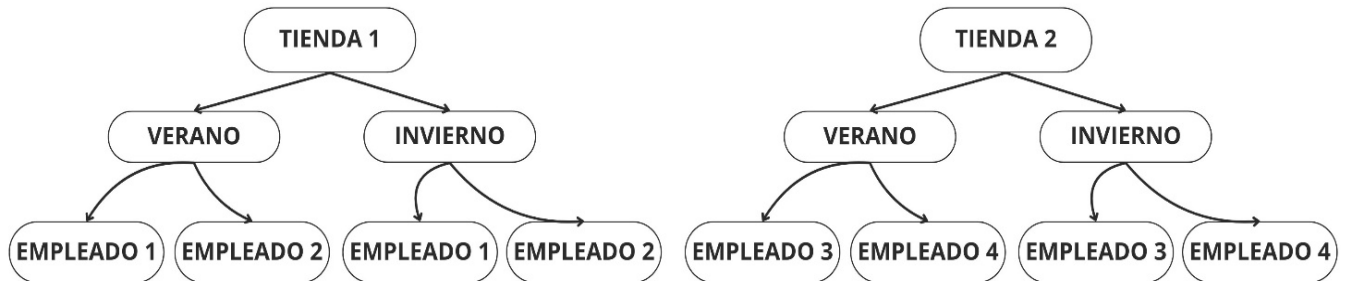


Figura. 1 Esquema Cruzado-Anidado. Tomado de Marín, J.M. (2009)

Se observa que el factor C (empleado) no está anidado en el cruce de los factores A y B (A*B) porque no está mezclado con una única combinación, ya que se supone que están los mismos empleados en verano e invierno. Así,

Empleados \subset Tiendas $\Rightarrow C \subset A$

Empleados * Ropa $\Rightarrow C * B$

Tiendas * Ropa $\Rightarrow A * B$

4.3. Modelo matemático

Según Marín, J.M. (2009), un factor B está anidado en otro factor cuando cada nivel del factor B aparece asociado a un único nivel del factor A. Este modelo se expresa como $B \subset A$:

$$y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_{j(i)} + \varepsilon_{ijk}$$

Los índices i, j, k representan los niveles dentro de los factores A, B, C respectivamente. Tal que a es el número de niveles del factor A, j corresponde al número de niveles del factor B anidados en el factor A y k corresponde al número de observaciones por cada uno de los niveles de B anidados

en A. Además, para cumplir con ciertas restricciones estadísticas, tanto la suma de los efectos de los niveles de B anidados dentro de un nivel específico de A, como la suma de los efectos de los niveles de A deben ser igual a cero:

$$\sum_{j=1}^b \beta_{j(i)} = 0$$

$$\sum_{i=1}^a \alpha_i = 0$$

Los estimadores de mínimos cuadrados se utilizan para obtener los valores de los parámetros $\mu, \alpha_i, \beta_{j(i)}$. El parámetro μ brinda una idea del valor promedio de todas las observaciones en el conjunto de datos, para entender cómo se distribuyen en general. El parámetro α_i representa los efectos individuales o específicos de cada grupo en los datos y el parámetro $\beta_{j(i)}$ permite comprender cómo ciertas variables tienen un impacto específico dentro de cada grupo. De esta forma, se tiene que,

$$\min_{\mu, \alpha_i, \beta_{j(i)}} \phi = \min_{\mu, \alpha_i, \beta_{j(i)}} \sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^b \sum_{k=1}^n (y_{ijk} - \mu - \alpha_i - \beta_{j(i)})^2$$

Así,

$$\frac{\partial \phi}{\partial \mu} = -2 \sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^b \sum_{k=1}^n (y_{ijk} - \mu - \alpha_i - \beta_{j(i)}) = 0 \Rightarrow$$

$$\hat{\mu} = \bar{y}_{..}$$

Para cada i fijado

$$\frac{\partial \phi}{\partial \alpha_i} = -2 \sum_{j=1}^b \sum_{k=1}^n (y_{ijk} - \mu - \alpha_i - \beta_{j(i)}) = 0 \Rightarrow$$

$$\sum_{j=1}^b \sum_{k=1}^n (y_{ijk} - bn\bar{y}_{...} - nb\alpha_i) = 0 \Rightarrow$$

$$\hat{\alpha}_i = \bar{y}_{i..} - \bar{y}_{...}$$

Para cada i y j fijado

$$\frac{\partial \phi}{\partial \beta_j(i)} = -2 \sum_{k=1}^n (y_{ijk} - \mu - \alpha_i - \beta_j(i)) = 0 \Rightarrow$$

$$\sum_{k=1}^n (y_{ijk} - n\bar{y}_{...} - n(\bar{y}_{i..} - \bar{y}_{...}) - n\beta_j(i)) = 0 \Rightarrow$$

$$\hat{\beta}_j(i) = \bar{y}_{ij.} - \bar{y}_{i..}$$

De este modo,

$$y_{ijk} = \bar{y}_{...} + (\bar{y}_{i..} - \bar{y}_{...}) + (\bar{y}_{ij.} - \bar{y}_{i..}) = \bar{y}_{ij.}$$

El número total de observaciones es $a \cdot b \cdot n$ y donde n es el número de observaciones para todos los niveles de B anidados en los niveles de A y asumiendo que se tiene un diseño balanceado, el número total de parámetros a estimar es $1 + (a - 1) + a(b - 1) = ab$, luego el número de grados de libertad total es $abn - ab = ab(n - 1)$. De este modo, la estimación de la varianza es

$$\hat{\sigma}^2 = \frac{\sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^b \sum_{k=1}^n (y_{ijk} - \bar{y}_{ij.})^2}{ab(n-1)}$$

Con respecto a la tabla de Anova, se considera la suma de cuadrados total

$$SCT = \sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^b \sum_{k=1}^n (y_{ijk} - \bar{y}_{...})^2$$

sumando y restando los términos $\pm \bar{y}_{i..} \pm \bar{y}_{ij.}$ se obtiene

$$\sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^b \sum_{k=1}^n (y_{ijk} - \bar{y}_{...})^2 = \sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^b \sum_{k=1}^n (\bar{y}_{i..} - \bar{y}_{...})^2 +$$

$$+ \sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^b \sum_{k=1}^n (\bar{y}_{ij\cdot} - \bar{y}_{i\cdot\cdot})^2 +$$

$$+ \sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^b \sum_{k=1}^n (y_{ijk} - y_{ij\cdot})^2$$

entonces

$$SCT = SCA + SCB(A) + SCE$$

que puesto en términos de totales queda

$$SCT = \sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^b \sum_{k=1}^n y_{ijk}^2 - \frac{1}{anb} y_{\cdot\cdot\cdot}^2$$

$$SCA = \frac{1}{bn} \sum_{i=1}^a y_{i\cdot\cdot}^2 - \frac{1}{anb} y_{\cdot\cdot\cdot}^2$$

para cada nivel i fijado se tiene

$$SCB(A)_i = \frac{1}{n} \sum_{j=1}^b y_{ij\cdot}^2 - \frac{1}{bn} y_{i\cdot\cdot}^2$$

y como $SCB(A) = \sum_{i=1}^a SCB(A)_i$, entonces

$$SCB(A) = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^b y_{ij\cdot}^2 - \frac{1}{bn} \sum_{i=1}^a y_{i\cdot\cdot}^2$$

$$SCE = SCT - SCA - SCB(A)$$

Los contrastes de hipótesis que se realizan son:

$$\begin{cases} H_0: \alpha_1 = \dots = \alpha_a = 0 \text{ (El factor A no tiene efecto en la variable de las observaciones)} \\ H_1: \text{algún } \alpha_i \neq 0 \text{ (el factor A tiene efecto en la variable de las observaciones)} \end{cases}$$

en este caso

$$F_0 = \frac{\frac{SCA}{a-1}}{\frac{SCE}{ab(n-1)}} = \frac{MCA}{MCE}$$

de modo que se rechaza H_0 a nivel α si

$$F_0 > F_{(a-1), ab(n-1), \alpha}$$

La otra hipótesis que contrasta es, $\forall_i = 1, \dots, a$

$$\begin{cases} H_0: \beta_{1(i)} = \dots = \beta_{b(i)} = 0 \\ H_1: \text{algún } \beta_{j(i)} \neq 0 \end{cases}$$

En este caso,

$$F_0 = \frac{\frac{SCB(A)}{a(b-1)}}{\frac{SCE}{ab(n-1)}} = \frac{MCB(A)}{MCE}$$

donde se rechaza H_0 a nivel α si

$$F_0 > F_{a(b-1), ab(n-1), \alpha}$$

En esta situación, se examina la hipótesis de que las variaciones del factor B, anidado en el factor A, son uniformes a través de todos los niveles de A. No obstante, cuando se sugieren diferencias significativas de forma global, surge el interés por determinar si, dentro de cada especificación i de A (donde i abarca de 1 a a), los niveles de B permanecen consistentes. Por tanto, se evalúa, para cada valor dado de i , la uniformidad de los niveles de B que están incorporados específicamente dentro de los distintos estratos de A.

$$\begin{cases} H_0: \beta_{1(i)} = \dots = \beta_{b(i)} = 0 \\ H_1: \text{algún } \beta_{j(i)} \neq 0 \end{cases}$$

en este caso,

$$F_0 = \frac{\frac{SCB(A)_i}{b-1}}{\frac{SCE}{ab(n-1)}} = \frac{MCB(A)_i}{MCE}$$

de modo que se rechaza H_0 a nivel α si

$$F_0 > F_{(b-1), ab(n-1), \alpha}$$

La tabla ANOVA es

F.V.	S.C.	G.L.	M.C	F
Factor A	SCA	a-1	$MCA = \frac{SCA}{\alpha(b-1)}$	$F_A = \frac{MCA}{MCE}$
Factor B ($B \subset A$)	SCB (A)	a(b-1)	$MCB(A) = \frac{SCB}{\alpha(b-1)}$	$F_{B(A)} = \frac{MCB(A)}{MCE}$
Residual	SCE	ab(n-1)	$MCE = \frac{SCE}{ab(n-1)}$	
Total	SCT	abn-1		

Si $F_{B(A)} = \frac{MCB(A)}{MCE}$ resulta ser significativo, entonces el contraste se puede descomponer en $i = 1, \dots, a$ contrastes individuales:

$$F_{B(A)_i} = \frac{MCB(A)_i}{MCE}$$

5. Metodología

El presente estudio corresponde a una investigación de carácter descriptivo e inferencial. Los datos utilizados provienen del proyecto 2839 de la Vicerrectoría de Investigación y Extensión (VIE) de la Universidad Industrial de Santander, titulado “Evaluación de la contaminación por microplásticos sobre la comunidad de zooplancton en el Parque Nacional Natural Corales de Profundidad (PNNCPR) y en el Parque Nacional Natural Corales del Rosario y de San Bernardo (PNNCRSB)”, donde se realizó un muestreo espacio-temporal de la abundancia de microplásticos en dos áreas protegidas ubicadas en el Caribe Colombiano.

5.1. Área de estudio

Este estudio se llevó a cabo en las Áreas Marinas Protegidas (AMP) del Caribe colombiano, en donde se encuentran dos parques nacionales: el Parque Nacional Natural Los Corales del Rosario y San Bernardo (PNNCRSB) y el Parque Nacional Natural Corales de Profundidad (PNNCPR).

El PNNCRSB inicia a 23 km al sur de la ciudad de Cartagena de Indias en el sector de Punta Gigante y a 35 km al noreste de la ciudad de Santiago de Tolú, alberga 120.000 hectáreas de ecosistemas marino-costeros con alta productividad de arrecifes de coral, pastos marinos, fondos sedimentarios, bosques de manglar y bosque seco tropical, en conjunto, cumplen un ciclo esencial para las formas de vida en la zona costera (Rangel-Buitrago, 2011).

Por otro lado, el PNNCPR se encuentra a 12 km del PNNCRSB y a 32 km aproximadamente del punto más cercano en el continente (Península de Barú). Cubre una muestra considerable de corales profundos asociados a una gran diversidad de invertebrados, y que incluyen, el 67% de corales de profundidad del caribe (PNNCPR, 2016).

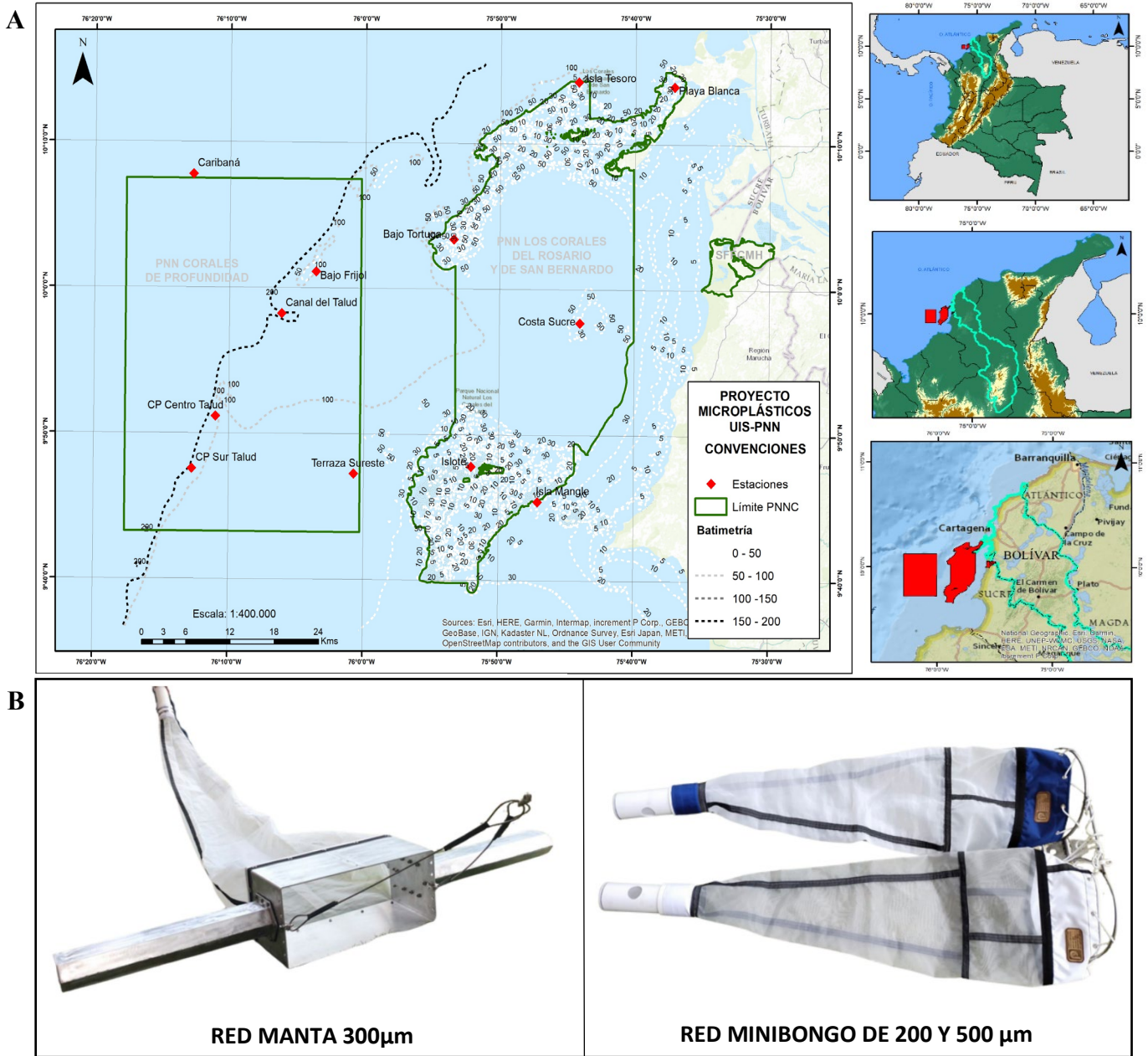


Figura. 2. A) Mapa de las 12 estaciones de muestreo (diamantes rojos) en el hábitat costero (PNNCRSB) y el hábitat oceánico (PNNCPR). Mapa creado por Parques Nacionales Naturales y tomado de Criales-Hernandez et al., *en prensa*. B) Redes utilizadas para el muestreo de microplásticos

5.2. Recolección de muestras

Se llevaron a cabo dos campañas de muestreo, del 17 al 22 marzo 2022, correspondiente a la temporada seca, y del 3 al 7 octubre 2022, cuya temporada es de precipitación. En cada una de las áreas marinas protegidas se ubicaron las estaciones a diferentes distancias de la línea de costa. En el Parque Nacional Natural Corales del Rosario y San Bernardo (PNNCRSB) se seleccionaron seis estaciones representativas del hábitat costero, mientras que en el Parque Nacional Natural Corales de Profundidad (PNNCPR) se seleccionaron seis estaciones correspondientes al hábitat oceánico, obteniendo un total de 12 puntos de muestreo (Fig. 2A). Estas estaciones han sido previamente predispuestas por Parques Nacionales Naturales.

En cada estación se realizó la recolección de microplásticos suspendidos en la superficie y en la columna de agua. Para las partículas suspendidas en la superficie del agua, se utilizó una red manta de 65 cm de ancho y 30 cm de alto, con una malla de 300 μm (Kovač Viršek et al., 2016). La red se arrastró a una velocidad constante de 3 nudos durante 30 minutos, con un 60% del área de la red sumergida. Las muestras se fijaron con etanol al 70%. Para la recolección de partículas en la columna de agua se empleó una red minibongo de 30 cm de diámetro, equipada con mallas de 200 μm y 500 μm . La red se arrastró de manera oblicua a una velocidad de 3 nudos durante 5 minutos. Las muestras se fijaron en formaldehído al 4% (Fig. 2B). El volumen de agua filtrada se determinó utilizando un flujómetro General Oceanic (Modelo No. 2030R) situado en la boca de cada red.

5.3. Análisis de laboratorio

Cada una de las muestras recolectadas fue dividida en dos mediante la cámara Motoda, una muestra se almacenó en la colección hidrobiológica de la Universidad Industrial de Santander y la otra muestra se utilizó para la caracterización del MPs siguiendo la propuesta de Kovač Viršek et

al. (2016). Se realizó una identificación visual de las partículas mediante el uso de cajas de Petri, en las cuales se contaron mediante inspección manual utilizando un estereomicroscopio Zeiss Discovery V12 con cámara acoplada AxioCam ERc5s Zeiss, el cual corresponde a un aparato para identificar objetos pequeños (un tipo de ‘lupa especializada’). La clasificación de las partículas se realizó siguiendo el protocolo de Kovač Viršek et al., (2016) el cual se basa en características de forma y color.

5.4. Análisis estadístico

Se llevó cabo análisis estadísticos descriptivos de la abundancia de microplásticos de acuerdo las variables extraídas. La base de datos generada contuvo 381 observaciones, de las cuales 226 correspondieron a la temporada de sequía y 155 a la de precipitaciones. Las variables analizadas fueron las siguientes:

Tabla 1. Descripción de variables

Variable	Tipo de variable	Clasificación de variable
Temporada	Catórica	No está anidado a ninguna variable
Hábitat	Catórica	No está anidado a ninguna variable
Estaciones	Catórica	Anidado al Hábitat
Red	Catórica	No está anidado a ninguna variable
Abundancia	Cualitativa	Variable respuesta

Se implementaron dos diseños de experimentos cruzados-anidados para determinar si existen diferencias en las abundancias de microplásticos en función de los factores. En el primer modelo, se consideraron como factores la temporada (seca vs lluviosa) y el hábitat (costero vs oceánico) y la anidación de las estaciones a los hábitats (Fig. 3).

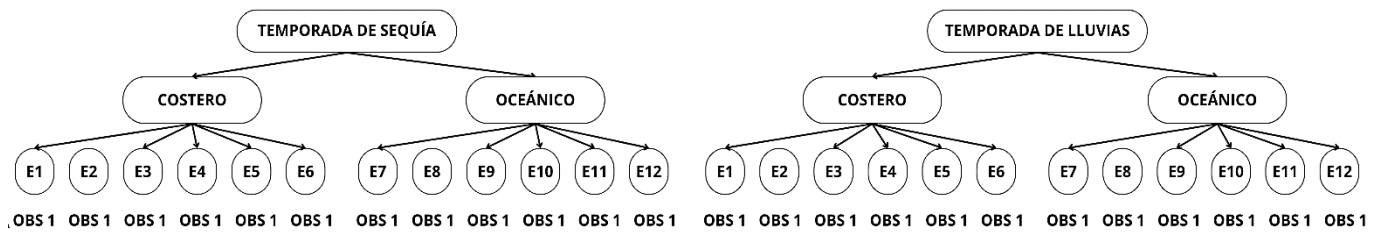


Figura. 3 Diseño cruzado-anidado con factores temporada, hábitat y estaciones anidadas al hábitat. E: indica las estaciones

En el segundo modelo se incorporó la variable referente a la posición de los microplásticos en el cuerpo de agua, es decir, si la recolecta de MPs se realizó mediante la red manta, el muestreo correspondería a una capa superficial del agua (S) o si la recolecta se realizó utilizando la red minibongo, esto indica que el muestreo de los MPs se realizó lo largo de la columna de agua (C) (Fig. 4).

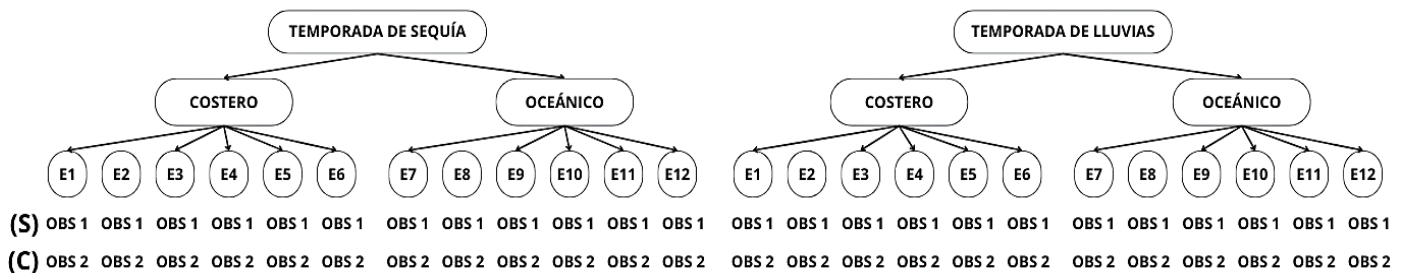


Figura. 4 Diseño Cruzado-anidado con factores temporada, hábitat y estaciones anidadas al hábitat y la posición de los microplásticos. E: indica las estaciones 1 a 12, S: indica que la muestra se recolectó de forma superficial (red manta); C: indica que la muestra se recolectó en la columna de agua (minibongo)

6. Resultados

6.1. Análisis exploratorio de datos (EDA)

En todas las estaciones analizadas, con todas las redes (Manta 300 μ m, Minibongo 200 y 500 μ m) en ambas temporadas (lluvia y seca) y en los dos hábitats (costero y oceánico), se encontró que la abundancia de MPs es de mínimo 0.002 y de máximo 7.46 MPs/m³, con una mediana de 0.058 MPs/m³ y una media aritmética de 0.264 ± 0.698 MPs/m³. En la temporada seca, la mediana de la abundancia de MPs en el hábitat costero fue de 0.058 MPs/m³ para la columna de agua y de 0.014 MPs/m³ para la superficie. En el hábitat oceánico, la mediana fue de 0.067 MPs/m³ en la columna de agua y de 0.028 MPs/m³ en la superficie. Durante la temporada de lluvia, la mediana de la abundancia MPs el hábitat costero fue de 0.197 MPs/m³ en la columna de agua y de 0.035 MPs/m³ en la superficie. En el hábitat oceánico, la mediana fue de 0.160 MPs/m³ en la columna y de 0.016 MPs/m³ en la superficie (Tabla. 2). La razón para considerar la mediana como la medida de tendencia central representativa se debe a que hay una alta presencia de datos atípicos, como se puede observar en la tabla 2.

Tabla 2. Medidas de tendencia central de la abundancia de MPs/m³ en función de la temporada, el hábitat y la posición de los microplásticos en el agua (agua superficial vs. columna de agua).

	Lluvia				Seca			
	Costero		Oceánico		Costero		Oceánico	
	Agua superficial	Columna de agua	Agua superficial	Columna de agua	Agua superficial	Columna de agua	Agua superficial	Columna de agua
n	36	49	31	39	47	77	32	70
Mínimo	0.003	0.029	0.003	0.041	0.002	0.009	0.002	0.009
Máximo	0.242	7.47	0.245	5.66	0.251	2.14	0.182	0.813
Mediana	0.035	0.197	0.016	0.16	0.014	0.058	0.028	0.067
Rango								
Inter cuartil	0.053	0.755	0.028	1.26	0.032	0.191	0.054	0.16
Media	0.051	0.76	0.046	0.79	0.033	0.223	0.048	0.13
Desviación Estándar	0.058	1.36	0.069	1.17	0.047	0.387	0.052	0.167

Intervalo de Confianza 95%	0.019	0.389	0.025	0.379	0.014	0.088	0.019	0.04
----------------------------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	------

La dispersión en los datos de abundancia de la columna de agua es mayor que en el agua superficial, lo que se puede observar en los diagramas de cajas y bigotes (Fig. 5). Durante la temporada de lluvias, los valores de abundancia de microplásticos son más variables en el hábitat oceánico en comparación con el costero. Durante la temporada seca, la dispersión es menor en ambos hábitats (Fig. 5). Se encontraron valores atípicos en ambas temporadas y hábitats.

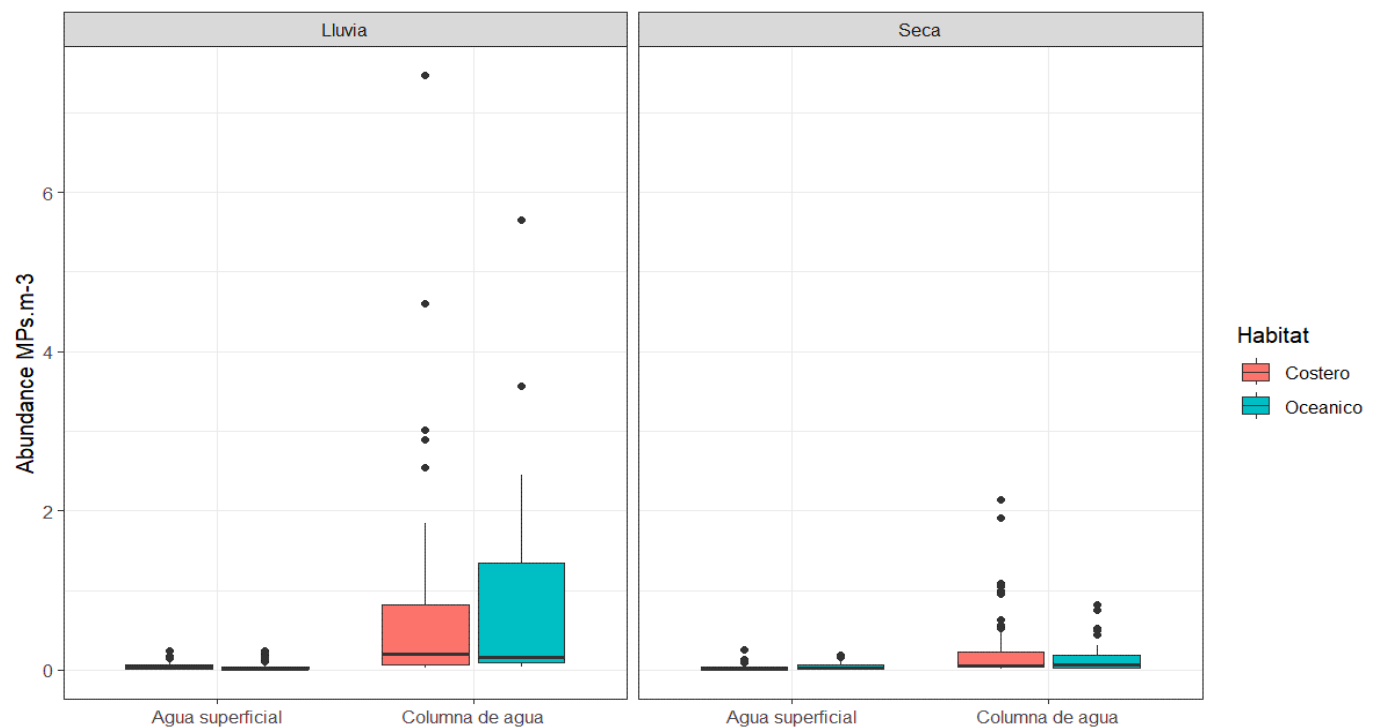


Figura. 5. Boxplot de la abundancia de MPs/m³ en función de la temporada, el hábitat y la posición de los microplásticos en el agua (agua superficial vs. columna de agua).

En cuanto a la comparación entre estaciones, las mayores abundancias de MPs durante la temporada seca fue en las estaciones Canal del Talud, localizada en el hábitat oceánico con una mediana de 0.08 MPs/m³, seguido de Islote, localizada en el hábitat costero, con una mediana de 0.06 MPs/m³. En la temporada de lluvias, la estación con la mayor abundancia de MPs fue Isla Mangle y Playa Blanca, ambas localizada en el hábitat costero, con una mediana de 0.19 MPs/m³ (Fig. 6).

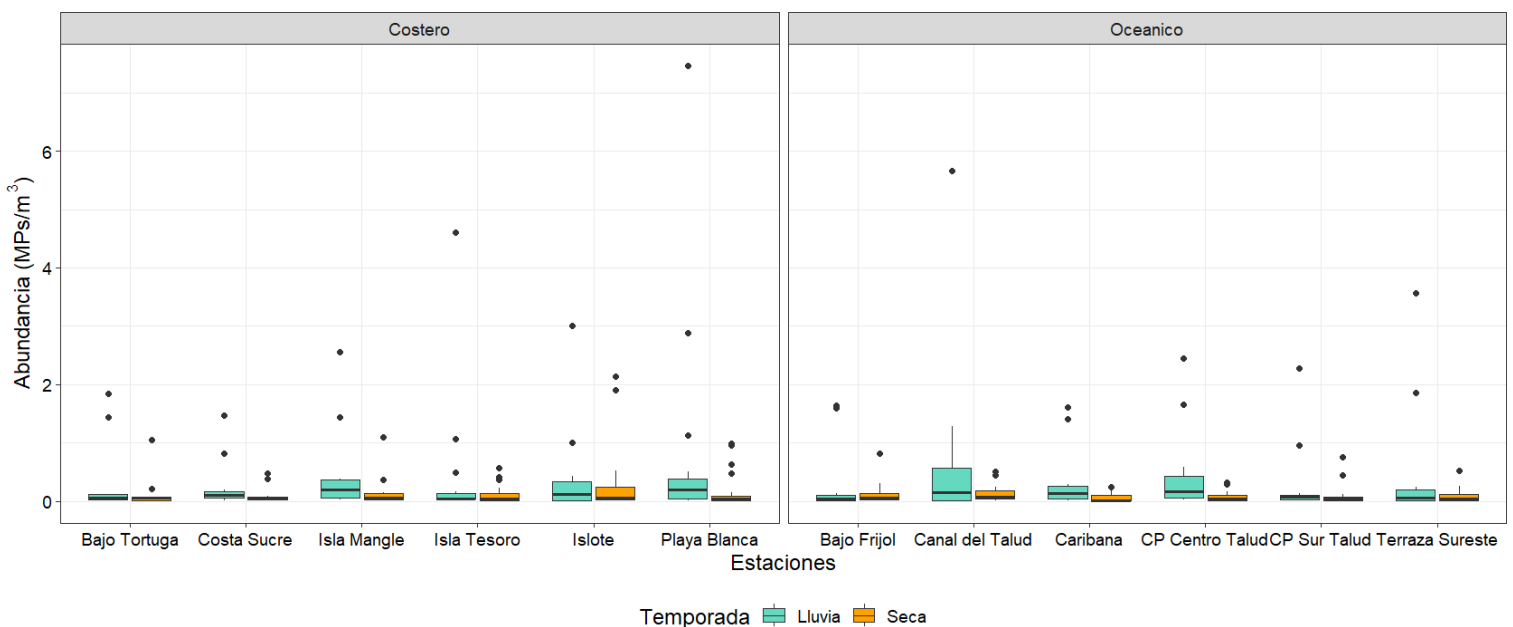


Figura. 6. Abundancia de MPs en las estaciones de las AMP

6.2. Modelos de los diseños de experimentos

El primer modelo (Fig. 3) analizó los efectos de la temporada (lluvia y seca) y el hábitat (costero y oceánico) como se puede observar en la figura 5. Se encontró que las medias de las temporadas sí presentan diferencias significativas, teniendo un valor p de 3.45×10^{-7} y un estadístico de prueba de 27.01. No se encontraron diferencias entre los hábitats.

Tabla 3. Tabla Anova para el primer modelo. Df: Grados de libertad; Sum Sq: Suma de cuadrados; F: F de Fisher; PR(>F): Valor p; Signif: código de significancia 0 “****” 0.001 “***” 0.01 “**” 0.05 “.” 0.1 “ “ 1.

	Df	Sum Sq	Media Sq	F	Pr (>F)	Signif
Temporada	1	10.04	10.037	27.011	3.45x10 ⁻⁷	***
Hábitat	1	0.07	0.070	0.189	0.663988	
Forma	4	8.03	2.007	5.400	0.000314	***
Color	4	32.14	8.035	21.622	5.94x10 ⁻¹⁶	***
Temporada:Habitat	1	0.06	0.056	0.150	0.698899	
Temporada:Habitat:Estaciones	20	5.24	0.262	0.704	0.822028	
Residual	349	129.68	0.372			

El segundo modelo (Fig. 4) incluyó, además de la temporada y el hábitat, la posición de recolecta (superficial y columna de agua). Se encontró que las medias de las temporadas sí presentan diferencia entre sí, teniendo un valor p de 5.16x10⁻⁸ y un estadístico de prueba de 31.06, en la posición de recolecta con un valor p de 3.33x10⁻¹⁰ y un estadístico de prueba de 41.96, y la interacción entre la temporada y la posición tuvo un valor p de 4.66x10⁻⁶ y un estadístico de prueba de 21.67. No se hallaron diferencias entre los hábitats evaluados (Tabla. 4).

Tabla 4. Tabla Anova para el primer modelo. Df: Grados de libertad; Sum Sq: Suma de cuadrados; F: F de Fisher; PR(>F): Valor p; Signif: código de significancia 0 “****” 0.001 “***” 0.01 “**” 0.05 “.” 0.1 “ “ 1.

	Df	Sum Sq	Media Sq	F	Pr(>F)	Signif
Temporada	1	10.04	10.037	31.060	5.16x10 ⁻⁰⁸	***
Habitat	1	0.07	0.070	0.217	0.64135	
Agua	1	13.56	13.559	41.961	3.33x10 ⁻¹⁰	***
Forma	4	5.23	1.307	4.046	0.00323	**
Color	4	31.92	7.981	24.697	< 2x10 ⁻¹⁶	***
Temporada:Habitat	1	0.15	0.146	0.450	0.50265	
Temporada:Agua	1	7.00	7.005	21.677	4.66x10 ⁻⁰⁶	***
Habitat:Agua	1	0.02	0.023	0.071	0.78957	
Temporada:Forma	2	1.00	0.502	1.554	0.21289	
Habitat:Forma	3	0.03	0.011	0.033	0.99185	

Agua:Forma	2	2.17	1.083	3.353	0.03616	*
Temporada:Habitat:Agua	1	0.22	0.218	0.673	0.41242	
Temporada:Habitat:Forma	1	0.01	0.006	0.019	0.88911	
Temporada:Agua:Forma	1	0.79	0.791	2.448	0.11865	
Habitat:Agua:Forma	1	0.05	0.054	0.168	0.68216	
Temporada:Habitat:Stations	20	5.03	0.252	0.779	0.73945	
Temporada:Habitat:Agua:Forma	1	0.02	0.020	0.063	0.80253	
Residuals	334	107.93	0.323			

El criterio de información Akaike* (AIC) arrojó un valor menor para el modelo 2 que incluyó una interacción más completa de los factores (Tabla 5.).

Tabla 5. Criterio de AIC de los modelos 1 y 2.

	Modelo 1	Modelo 2
df (grados de libertad)	33	48
AIC	736.6261	696.6674

6.3. Comparación múltiple

Los resultados de la prueba de Tukey** realizada sobre los dos modelos obtuvieron diferencias entre las medianas de múltiples pares de grupos en los dos modelos analizados. En el primer modelo, el cual presentó mayor criterio de Akaike, se identificaron diferencias de las medias entre las temporadas seca - lluviosa con un p valor de 3×10^{-7} , asimismo se registraron diferencias de las medias en la interacción entre temporada y hábitat (Tabla 6). Los intervalos de confianza para estas comparaciones excluyeron el cero, confirmando así la significancia estadística de las diferencias entre los grupos examinados. No se encontraron diferencias entre el hábitat ni entre las interacciones Lluvia Oceánico – Lluvia Costero, Seca Oceánico – Seca Costero ni entre la interacción temporada, hábitat, estaciones (Anexo S1).

*Medida de la calidad relativa de un modelo estadístico para un conjunto de datos determinado. Fue desarrollado por Hirotugu Akaike en la década de 1970 como un criterio de selección de modelos.

**Consiste en comparar las medias de los tratamientos contrastados. Para este método se requiere que $n_i = n$, en caso de no cumplirse, se forma $n = \min[n_i]$

Tabla 6. Diferencias significativas entre la interacción Temporada-Hábitat del modelo 1.

	Diferencia	Inferior	Superior	p ajustado
Seca-Lluvia	-0.3303	-0.4554	-0.2053	3×10^{-07}
Seca Costero – Lluvia Costero	-0.2927	-0.5041	-0.0813	0.0022
Seca Oceanico – Lluvia Costero	-0.3539	-0.5744	-0.1334	0.0002
Lluvia Oceanico – Seca Costero	0.3149	0.09050	0.5393	0.0018
Seca Oceanico – Lluvia Oceanico	-0.3761	-0.6091	-0.1431	0.0002

En el segundo modelo se identificaron diferencias de las medias entre las temporadas seca- lluviosa con un valor p de 5.16×10^{-8} y entre la posición de recolecta columna de agua-agua superficial con un valor p de 3.88×10^{-10} . También se encontraron diferencias de las medias entre las interacciones de temporada - hábitat y temporada -posición (Tabla 7.). No se identificaron diferencias entre las medias de los hábitats (Anexo S2).

Tabla 7. Diferencias significativas entre la interacción Temporada-Hábitat, Temporada-Posición del modelo 2.

	Diferencia	Inferior	Superior	p ajustado
Seca Costero-Lluvia Costero	-2.9×10^{-01}	-5.0×10^{-01}	-8.8×10^{-02}	1.6×10^{-03}
Seca Oceánico-Lluvia Costero	-3.5×10^{-01}	-5.7×10^{-01}	-1.4×10^{-01}	1.7×10^{-04}
Lluvia Oceánico-Seca Costero	3.1×10^{-01}	9.5×10^{-02}	5.3×10^{-01}	1.4×10^{-03}
Seca Oceánico-Lluvia Oceánico	-3.7×10^{-01}	-6.0×10^{-01}	-1.5×10^{-01}	1.7×10^{-04}
Lluvia Columna de agua-Lluvia Agua superficial	7.1×10^{-01}	4.7×10^{-01}	9.5×10^{-01}	1.2×10^{-12}
Lluvia Columna de agua-Seca Agua superficial	7.4×10^{-01}	5.1×10^{-01}	9.6×10^{-01}	3.1×10^{-13}
Seca Columna de agua-Lluvia Columna de agua	-5.8×10^{-01}	-7.8×10^{-01}	-3.9×10^{-01}	1.8×10^{-12}
Costero Columna de agua-Costero Agua superficial	4.0×10^{-01}	1.9×10^{-01}	6.1×10^{-01}	5.4×10^{-06}
Oceánico Columna de agua-Costero Agua superficial	3.5×10^{-01}	1.4×10^{-01}	5.6×10^{-01}	1.8×10^{-04}
Costero Columna de agua-Oceánico Agua superficial	4.2×10^{-01}	1.9×10^{-01}	6.5×10^{-01}	1.5×10^{-05}
Oceánico Columna de agua-Oceánico Agua superficial	3.7×10^{-01}	1.4×10^{-01}	6.0×10^{-01}	3.2×10^{-04}

6.4. Validación de los modelos

Se evaluó el cumplimiento del supuesto de normalidad de los residuos para el modelo 2 mediante el análisis visual de los gráficos Q-Q y la prueba formal de Shapiro-Wilk. Los modelos no mostraron que se cumple el supuesto de normalidad, como se observa en la Fig. 7.

Para confirmar estos resultados, se aplicó la prueba de Shapiro-Wilk a los residuos de cada modelo. El modelo 1, obtuvo un valor W de 0.64041 y un valor p de 2.2×10^{-16} , mientras que el modelo 2, obtuvo un valor W de 0.67149 y un valor p de 2.2×10^{-16} (Fig. 7). Evidenciando suficientes diferencias para rechazar la hipótesis nula de normalidad de los residuos en ambos modelos.

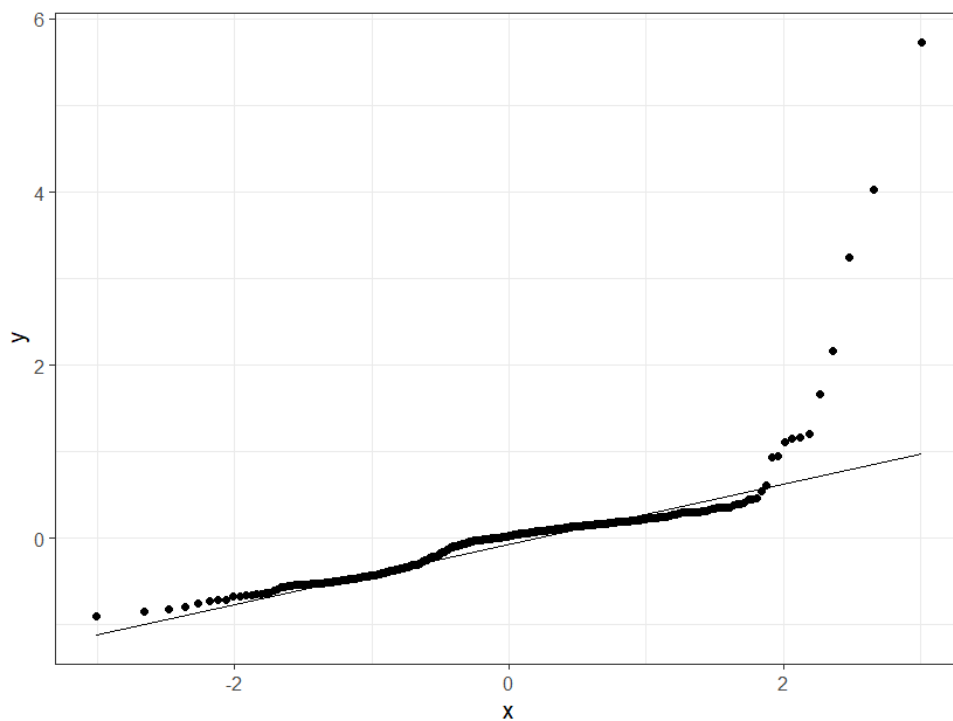


Figura. 7. Gráfico Q-Q plot para el modelo 2.

Se evaluó la homogeneidad de la varianza de las variables correspondientes mediante el gráfico de Residuales vs valores Ajustados (Fig. 8) donde se identificó que al aumentar un residual, la

variabilidad aumenta ('tubo más ancho'), lo que indica que hay heterocedasticidad en los datos, razón por la cual se toma un modelo con más factores.

Se aplicó la prueba Levene donde el modelo 1 obtuvo un valor p igual a 0.0036 y un estadístico de prueba de 4.57. Asimismo, el modelo 2 tuvo un valor p de 1.84×10^{-18} y estadístico de prueba de 13.631 (Fig. 8) indicando que hay evidencia suficiente para rechazar la hipótesis nula de que las varianzas son iguales.

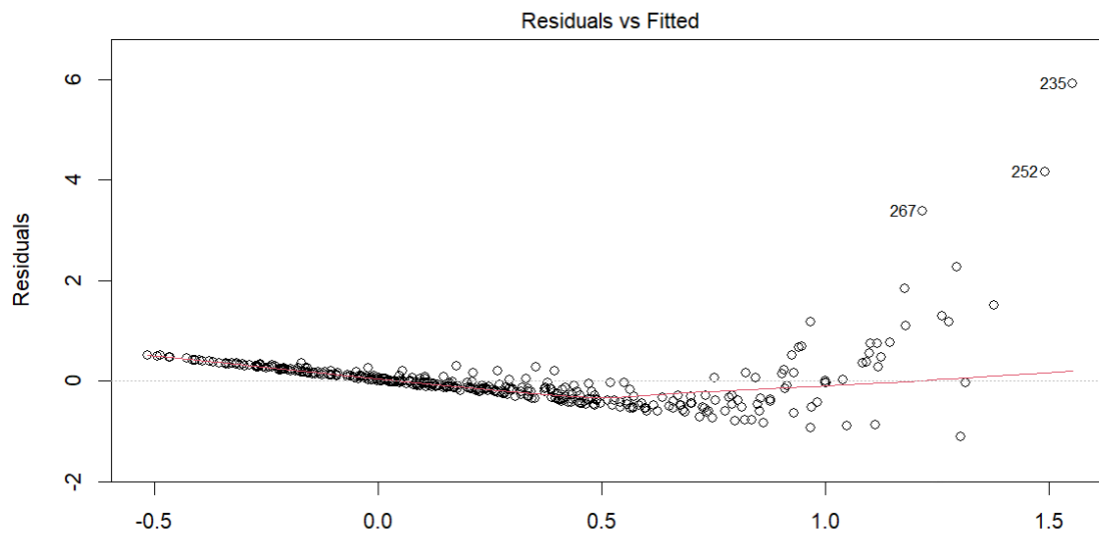


Figura. 8. Gráfico de Residuales vs Ajustados para el modelo 2.

6.5. Aplicación de alternativa para datos no paramétricos

Debido a que la distribución de los datos no se ajustaba al supuesto de normalidad, se recurrió a métodos de análisis no paramétricos. Por consiguiente, se empleó un análisis no paramétrico, mediante el test de aleatorización aplicada al conjunto de datos de la siguiente forma.

- Paso 1: Se seleccionó el mejor modelo estadístico bajo el criterio de Akaike siendo el modelo 2 quien presentó el menor valor en comparación con el modelo 1, lo que sugiere un mejor ajuste a los datos observados. A partir de este modelo, se obtuvo un valor p de 5.1611×10^{-08} .

- Paso 2: Se aplicó un método de remuestreo directamente al conjunto de datos para obtener distintos valores p para un análisis más robusto.
- Paso 3: Para cada conjunto obtenido en el paso 2 de remuestreo, se calculó el estadístico de prueba como medida para la prueba de hipótesis.
- Paso 4: Se comparó el valor p del modelo 2 con el asociado al $1-\alpha$. El valor de p para el modelo 2 fue de 5.1611×10^{-08} , el cual es menor en comparación al valor p asociado al cuantil 95% de los valores F generados por la prueba de aleatorización, el cual es de 0.6718. Esto indica el rechazo de la hipótesis nula que es: “los factores no influyen en la abundancia de MPs”. Por lo tanto, hay evidencia estadísticamente significativa para no rechazar que los factores considerados en el modelo 2 influyen en la abundancia de microplásticos.

La variación en la abundancia de microplásticos (MPs) se puede observar en las gráficas de cajas y bigotes. Durante la temporada de lluvias se observa un aumento en la abundancia de MPs comparado con la temporada seca (Fig. 9A). Con respecto a los diferentes hábitats analizados, las comparaciones no revelaron variaciones en la abundancia de MPs (Fig. 9B). Con respecto a la posición de los MPs en el agua, es decir, en la recolección de muestra superficial, se puede observar una mayor abundancia que en la recolección realizada en la columna de agua (Fig. 9C). Asimismo, se observa una gran cantidad de datos atípicos en todos los factores evaluados. En el Anexo S3 se encuentra el código en lenguaje R.

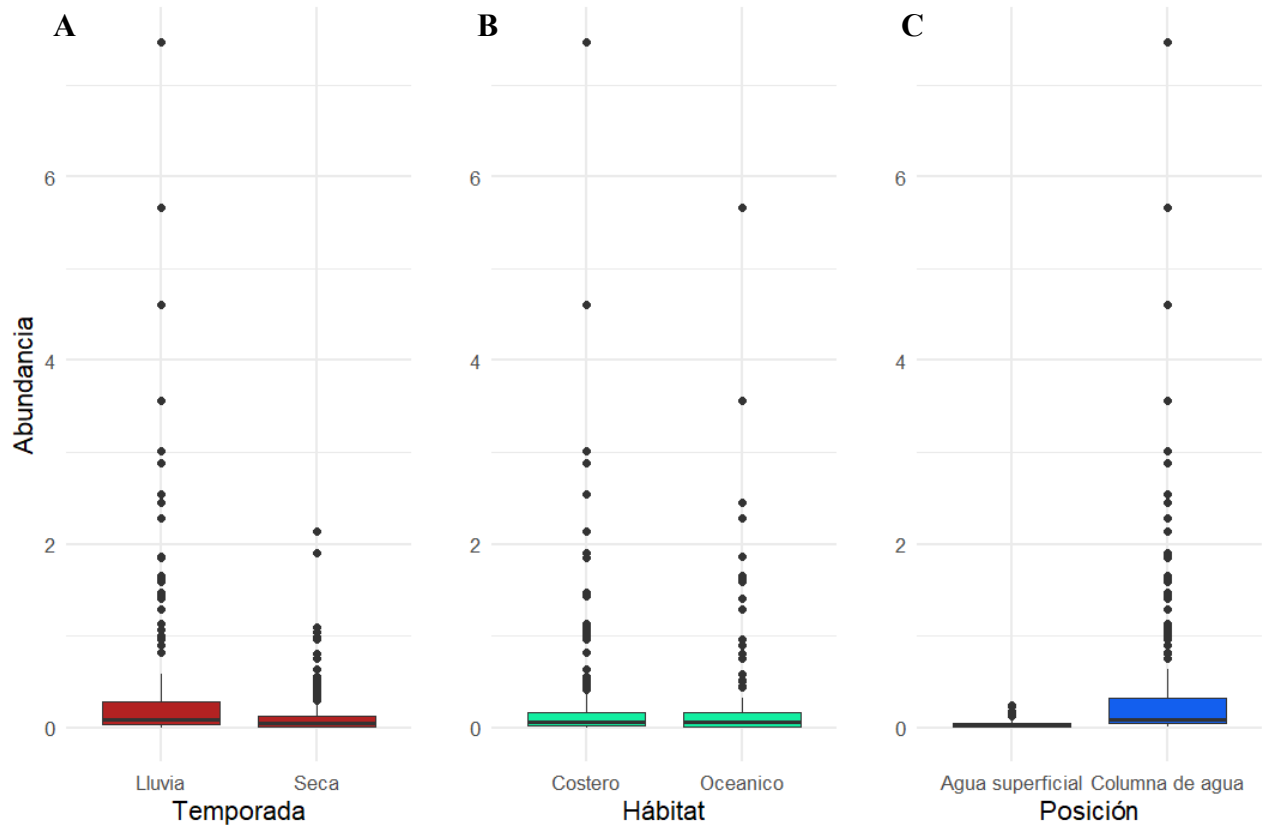


Figura. 9. Comparación de la abundancia de MPs según temporada, hábitat y posición del MPs en el agua.

7. Discusión

Se determinó que las temporadas influyen en la abundancia de microplásticos de las AMP. Durante la temporada de lluvias, se observó un incremento en la abundancia de MPs, este evento podría estar vinculado a los 228 km³ de agua que drena el Canal del Dique sobre el AMP (Arroyave et al., 2014), especialmente sobre el PNNCRSB, donde se encuentra localizada la estación Playa blanca, en esta estación cercana a la desembocadura del canal se obtuvo la mayor cantidad de MPs. El flujo de agua del Canal depende principalmente del río Magdalena, que descarga sus sedimentos y diferentes contaminantes provenientes del interior del territorio colombiano en sentido sur-norte y puede estar arrastrando MPs junto a los sedimentos y demás compuestos tóxicos que aumenta en la temporada de lluvias (Giraldo et al., 2009; Rangel-Buitrago et al., 2018, Vargas, 2021). Esta influencia del Canal del Dique ha evidenciado daños en la biota del área como los corales (Mejia-Echeverry et al., 2018)

Por el contrario, el AMP en el hábitat oceánico, correspondiente al Parque Nacional Natural Corales de Profundidad (PNNCPR), se ve mayormente afectado por la influencia continental del de Centroamérica y del sur del Caribe Colombiano durante la temporada seca por patrón ciclónico de las corrientes marinas Panamá-Colombia que se desplazan en sentido contrario a las manecillas del reloj desde el sur del Caribe colombiano y Panamá, cual arrastra de manera activa sedimentos y posibles elementos de materiales distintos a los nutrientes (Andrade, 2001; Criales-Hernandez et al., 2021). De esta forma el arrastre afecta a la zona oceánica en temporada de sequía, y aumenta la cantidad de MPs en las estaciones como Canal del Talud.

No se encontraron diferencias en las medias entre los hábitats oceánicos, lo que puede indicar que las dinámicas de los MPs son similares en ambos hábitats. No obstante, si se encontraron diferencias entre la interacción de las temporadas y los hábitats. Adicionalmente, el

modelo 2 detectó diferencias en las medias entre la posición de los microplásticos, siendo mayor en la columna de agua que en la superficie, esto puede tener inconvenientes debido a que incrementa el riesgo de ingesta por parte de organismos marinos con distintos hábitos alimenticios que viven en la columna de agua (Cole et al., 2011; Timilsina et al., 2023; Iwalaye & Maldonado, 2024). En el caso de los consumidores primarios, como el zooplancton, se ha demostrado que la ingesta de MPs puede provocar su acumulación en el tracto digestivo (He et al., 2022). Estos MPs presentan respuestas toxicológicas, lo que comprueba su capacidad para acumular y transportar elementos tóxicos (Acosta-Coley et al., 2019). Se han observado copépodos que consumieron MPs en forma de filamentos con tamaños que oscilan entre 341 μm y 1,05 mm, y de colores transparente, azul y rojo (Miller et al., 2023). Se han encontrado crustáceos que han ingerido filamentos con un tamaño promedio de 1,20 mm y peces que han consumido filamentos de tamaños que van desde 109 μm hasta 5,08 mm, seguidos de fragmentos que varían entre 75,1 μm y 1,84 mm, siendo el filamento azul el más abundante (Miller et al., 2023). También se ha encontrado que las larvas de decápodos (Decapoda-megalopa) solo consumen fibras (Zavala-Alarcon et al., 2023).

Desde un enfoque estadístico, la elección de un enfoque cruzado-anidado ha permitido observar tanto la influencia principal de los factores como las interacciones entre los mismos, ya que la estructura de las variables presenta un anidamiento de subgrupos dentro de uno de los factores principales (Piepho et al., 2026; Polat et al., 2021), así como las interacciones entre subgrupos logrando observar la complejidad de la dinámica real de los factores de temporada, hábitat y las estaciones anidadas a los hábitats.

El segundo modelo en comparación con el primer modelo tuvo un menor AIC, es decir, tiene un mejor ajuste a los datos evaluados e incluye una interacción más completa de factores

adicionales como la posición de recolecta (superficial y columna de agua). Este modelo no cumplió con los supuestos de normalidad de los residuales, por lo que se optó por una metodología no paramétrica: una prueba de aleatorización (Sawilowsky et al., 1990). Este enfoque enfatiza la importancia del uso de métodos no paramétricos robustos, como las técnicas de aleatorización para validar los resultados y permite obtener inferencias que no dependan de la distribución normal. Los análisis estadísticos tanto paramétricos como no paramétricos han revelado que la abundancia de MPs en las AMP está significativamente influenciada por la temporada, las estaciones anidadas a los hábitats, la interacción de las temporadas y los hábitats, la posición de los MPs en el agua.

8. Conclusiones

Este estudio ha evidenciado que los niveles de microplásticos (MPs) en las Áreas Marinas Protegidas (AMP) del Caribe colombiano están fuertemente influenciados por las variaciones temporales, con incrementos significativos durante la temporada de lluvias. Los resultados explican una posible conexión entre estos aumentos de MPs y los aportes del Canal del Dique, alimentado a su vez por el río Magdalena que afecta a al hábitat costero. Durante la temporada de sequía se explica una conexión con los patrones marinos ciclónicos de Panamá-Colombia para el aumento de MPs en el hábitat oceánico.

El análisis estadístico robusto ha revelado la importancia de examinar tanto la columna de agua como la superficie para entender mejor el riesgo que los MPs representan para los organismos marinos.

Los hallazgos respaldan la necesidad de fortalecer las estrategias de mitigación de MPs, mejorando el manejo de desechos y el tratamiento de las aguas residuales, y destacan la relevancia

de una gestión ambiental para proteger estas zonas críticas para la conservación de la diversidad marina.

Referencias Bibliográficas

- Anbumani, S., & Kakkar, P. (2018). Ecotoxicological effects of microplastics on biota: a review. In *Environmental Science and Pollution Research* (Vol. 25, Issue 15, pp. 14373–14396). Springer Verlag. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-1999-x>
- Andrady, A. L. (2011). Microplastics in the marine environment. In *Marine Pollution Bulletin* (Vol. 62, Issue 8, pp. 1596–1605). <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2011.05.030>
- Arroyave Acevedo, L., Bermúdez Moreno, Y., & Villada Sierra, L. A. (2014). *Impacto de la sedimentación en los corales de Islas del Rosario y San Bernardo, Colombia*.
- Bhat, M. A. (2023). Indoor microplastics: a comprehensive review and bibliometric analysis. In *Environmental science and pollution research international* (Vol. 30, Issue 58, pp. 121269–121291). <https://doi.org/10.1007/s11356-023-30902-0>
- Cole, M., Lindeque, P., Halsband, C., & Galloway, T. S. (2011). Microplastics as contaminants in the marine environment: A review. *Marine Pollution Bulletin*, 62(12), 2588–2597. <https://doi.org/10.1016/J.MARPOLBUL.2011.09.025>
- Garcés-Ordóñez, O., Espinosa, L. F., Muniz, M. C., Borba, L., Pereira, S., & Meigikos Dos Anjos, R. (2021). *Abundance, distribution, and characteristics of microplastics in coastal surface waters of the Colombian Caribbean and Pacific*. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-13723-x>/Published
- Garcés-Ordóñez, O., Saldarriaga-Vélez, J. F., Espinosa-Díaz, L. F., Canals, M., Sánchez-Vidal, A., & Thiel, M. (2022). A systematic review on microplastic pollution in water, sediments, and organisms from 50 coastal lagoons across the globe. *Environmental Pollution*, 315, 120366. <https://doi.org/10.1016/J.ENVPOL.2022.120366>

- De Sá, L. C., Oliveira, M., Ribeiro, F., Rocha, T. L., & Futter, M. N. (2018). Studies of the effects of microplastics on aquatic organisms: what do we know and where should we focus our efforts in the future?. *Science of the total environment*, 645, 1029-1039.
- Duncan, E. M., Broderick, A. C., Fuller, W. J., Galloway, T. S., Godfrey, M. H., Hamann, M., ... & Godley, B. J. (2019). Microplastic ingestion ubiquitous in marine turtles. *Global change biology*, 25(2), 744-752
- He, M., Yan, M., Chen, X., Wang, X., Gong, H., Wang, W., & Wang, J. (2022). Bioavailability and toxicity of microplastics to zooplankton. *Gondwana Research*, 108, 120–126. <https://doi.org/10.1016/j.gr.2021.07.021>
- Iwalaye, O. A., & Maldonado, M. T. (2024). Microcosm study of the effects of polyester microfibers on the indigenous marine amphipod (*Cyphocaris challengerii*) in the Strait of Georgia (BC, Canada). *Science of The Total Environment*, 906, 167301. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2023.167301>
- Izquierdo Ilzarbe, L., Tanco, M., Viles, E., & Sánchez-Arjona Álvarez, M. J. (2007). El diseño de experimentos como herramienta para la mejora de los procesos. Aplicación de la metodología al caso de una catapulta. *Tecnura*, 10(20), 127–138.
- Khanjani, M. H., Sharifinia, M., & Mohammadi, A. R. (2023). The impact of microplastics on bivalve mollusks: A bibliometric and scientific review. *Marine Pollution Bulletin*, 194, 115271. <https://doi.org/10.1016/J.MARPOLBUL.2023.115271>
- Kovač Viršek, M., Palatinus, A., Koren, Š., Peterlin, M., Horvat, P., & Kržan, A. (2016). Protocol for Microplastics Sampling on the Sea Surface and Sample Analysis. *Journal of Visualized Experiments : JoVE*, 118, 1–9. <https://doi.org/10.3791/55161>

- Lanctôt, C. M., Bednarz, V. N., Melvin, S., Jacob, H., Oberhaensli, F., Swarzenski, P. W., Ferrier-Pagès, C., Carroll, A. R., & Metian, M. (2020). Physiological stress response of the scleractinian coral *Stylophora pistillata* exposed to polyethylene microplastics. *Environmental Pollution*, 263, 114559. <https://doi.org/10.1016/J.ENVPOL.2020.114559>
- Marín, J.M. (2009) Notas de Clase de Diseño de Experimentos. Universidad Carlos III de Madrid
- Miller, M. E., Motti, C. A., Hamann, M., & Kroon, F. J. (2023). Assessment of microplastic bioconcentration, bioaccumulation and biomagnification in a simple coral reef food web. *Science of The Total Environment*, 858, 159615. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2022.159615>
- Montgomery, D. C. (2017). *Design and analysis of experiments* (Ninth). 2017.
- McNeish, R. E., Kim, L. H., Barrett, H. A., Mason, S. A., Kelly, J. J., & Hoellein, T. J. (2018). Microplastic in riverine fish is connected to species traits. *Scientific reports*, 8(1), 1-12.
- Nihei, Y., Ota, H., Tanaka, M., Kataoka, T., & Kashiwada, J. (2024). Comparison of concentration, shape, and polymer composition between microplastics and mesoplastics in Japanese river waters. *Water Research*, 249, 120979. <https://doi.org/10.1016/J.WATRES.2023.120979>
- Nunes, B. Z., Huang, Y., Ribeiro, V. V., Wu, S., Holbech, H., Moreira, L. B., ... & Castro, I. B. (2023). Microplastic contamination in seawater across global marine protected areas boundaries. *Environmental Pollution*, 316, 120692.
- Parques Nacionales Naturales de Colombia, Jiménez, M., Territorial, D., Luz, C., Angarita, E., Marcela, C., Hernán, S., Barbosa, Y., Cecilia, M., Leguizamón, D., Eraso, O., & Barrero, A. (2016). *Plan de Manejo del Parque Nacional Natural Corales de Profundidad*.

- Piepho, H. P., & Williams, E. R. (2006). A comparison of experimental designs for selection in breeding trials with nested treatment structure. *Theoretical and Applied Genetics*, 113, 1505-1513.
- Polat, M., & Turhan, N. S. (2021). Applying generalizability theory in language testing: Comparing nested and crossed scoring designs in the assessment of speaking skills: Comparing nested and crossed scoring designs in the assessment of speaking skills. *International Journal of Curriculum and Instruction*, 13(3), 3344-3358
- Ramkumar, M., Balasubramani, K., Santosh, M., & Nagarajan, R. (2022). The plastisphere: A morphometric genetic classification of plastic pollutants in the natural environment. *Gondwana Research*, 108, 4–12. <https://doi.org/10.1016/j.gr.2021.07.004>
- Rangel-Buitrago, N. G. (2011). *GEOMORFOLOGÍA, SEDIMENTOS, Y NT ERVENCIONES ANTROPOGÉNICAS Y AMENAZAS NATURAL ES* (pp. 55–66).
- Rangel-Buitrago, N., Velez-Mendoza, A., Gracia C., A., & Neal, W. J. (2020). The impact of anthropogenic litter on Colombia's central Caribbean beaches. *Marine Pollution Bulletin*, 152, 110909. <https://doi.org/10.1016/J.MARPOLBUL.2020.110909>
- Ritchie Hannah (2023) - "How much plastic waste ends up in the ocean?" Published online at OurWorldInData.org. Retrieved from: '<https://ourworldindata.org/how-much-plastic-waste-ends-up-in-the-ocean>' [Online Resource]
- Sawilowsky, S. S. (1990). Nonparametric tests of interaction in experimental design. *Review of Educational Research*, 60(1), 91-126.
- Thacharodi, A., Hassan, S., Meenatchi, R., Bhat, M. A., Hussain, N., Arockiaraj, J., Ngo, H. H., Sharma, A., Nguyen, H. T., & Pugazhendhi, A. (2024). Mitigating microplastic pollution: A critical review on the effects, remediation, and utilization strategies of microplastics. *Journal*

of Environmental Management, 351, 119988.
<https://doi.org/10.1016/J.JENVMAN.2023.119988>

Timilsina, A., Adhikari, K., Yadav, A. K., Joshi, P., Ramena, G., & Bohara, K. (2023). Effects of microplastics and nanoplastics in shrimp: Mechanisms of plastic particle and contaminant distribution and subsequent effects after uptake. *Science of The Total Environment*, 894, 164999. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2023.164999>

Williams, A. T., Rangel-Buitrago, N. G., Anfuso, G., Cervantes, O., & Botero, C. M. (2016). Litter impacts on scenery and tourism on the Colombian north Caribbean coast. *Tourism Management*, 55, 209–224. <https://doi.org/10.1016/J.TOURMAN.2016.02.008>

Wright, S. L., Thompson, R. C., & Galloway, T. S. (2013). The physical impacts of microplastics on marine organisms: A review. In *Environmental pollution (Barking, Essex : 1987)* (Vol. 178, pp. 483–492). <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2013.02.031>

Polat, M., & Turhan, N. S. (2021). Applying generalizability theory in language testing: Comparing nested and crossed scoring designs in the asses

Anexos

Anexo 1. Resultados de Tukey primer modelo.

```

mod1 <- TukeyHSD(modelo1)

## Tukey multiple comparisons of means
## 95% family-wise confidence level
##
## Fit: aov(formula = MP_Abundancia$Abundance ~ MP_Abundancia$Season * MP
_Abundancia$Habitat + MP_Abundancia$Shape + MP_Abundancia$Colors + MP_Abu
ndancia$Season * MP_Abundancia$Habitat/MP_Abundancia$Stations)
##
## $`MP_Abundancia$Season`
##          diff          lwr          upr p adj
## Seca-Lluvia -0.3303991 -0.4554333 -0.205365 3e-07
##
## $`MP_Abundancia$Habitat`
##          diff          lwr          upr    p adj
## Oceanico-Costero -0.02728523 -0.1507126 0.09614211 0.6639883
##
## $`MP_Abundancia$Shape`
##          diff          lwr          upr    p adj
## Filamento-Espuma 0.54539657 -0.6408842 1.7316773 0.7154784
## Film-Espuma 0.28054033 -1.0842503 1.6453309 0.9801672
## Fragmento-Espuma 0.23212824 -0.9615760 1.4258325 0.9838685
## Pellet-Espuma -0.01483102 -2.0620169 2.0323549 1.0000000
## Film-Filamento -0.26485623 -0.9547369 0.4250244 0.8303997
## Fragmento-Filamento -0.31326833 -0.5087467 -0.1177900 0.0001432
## Pellet-Filamento -0.56022758 -2.2348177 1.1143625 0.8901264
## Fragmento-Film -0.04841209 -0.7509811 0.6541569 0.9997144
## Pellet-Film -0.29537135 -2.1008196 1.5100769 0.9916016
## Pellet-Fragmento -0.24695926 -1.9268164 1.4328979 0.9944242
##
## $`MP_Abundancia$Colors`
##          diff          lwr          upr    p adj
## Blanco-Azul -0.5812114097 -0.8661131 -0.2963097 0.0000004
## Negro-Azul -0.5963360707 -0.8796413 -0.3130308 0.0000002
## Otros-Azul -0.7116261912 -0.9530991 -0.4701533 0.0000000
## Rojo-Azul -0.7119585790 -0.9692320 -0.4546852 0.0000000
## Negro-Blanco -0.0151246610 -0.3324449 0.3021956 0.9999340
## Otros-Blanco -0.1304147815 -0.4110203 0.1501907 0.7071309
## Rojo-Blanco -0.1307471693 -0.4250598 0.1635654 0.7408279
## Otros-Negro -0.1152901206 -0.3942745 0.1636943 0.7888531
## Rojo-Negro -0.1156225083 -0.4083899 0.1771449 0.8152890
## Rojo-Otros -0.0003323877 -0.2528399 0.2521752 1.0000000
##
## $`MP_Abundancia$Season:MP_Abundancia$Habitat`
##          diff          lwr          upr
## p adj

```

```
## Seca:Costero-Lluvia:Costero    -0.308139893 -0.52972788 -0.08655191 0.
0021340
## Lluvia:Oceanico-Lluvia:Costero  0.001967797 -0.25201292  0.25594851 0.
9999971
## Seca:Oceanico-Lluvia:Costero    -0.355490282 -0.58659277 -0.12438779 0.
0005028
## Lluvia:Oceanico-Seca:Costero     0.310107691  0.07485512  0.54536026 0.
0041289
## Seca:Oceanico-Seca:Costero       -0.047350389 -0.25769755  0.16299678 0.
9377260
## Seca:Oceanico-Lluvia:Oceanico    -0.357458079 -0.60169341 -0.11322275 0.
0010618
##
```

Anexo 2. Resultados de Tukey segundo modelo

```

## Tukey multiple comparisons of means
## 95% family-wise confidence level
##
## Fit: aov(formula = MP_Abundancia$Abundance ~ MP_Abundancia$Season * MP
_Abundancia$Habitat * MP_Abundancia$Agua * MP_Abundancia$Shape + MP_Abund
ancia$Colors + MP_Abundancia$Season * MP_Abundancia$Habitat/MP_Abundancia
$Stations)
##
## $`MP_Abundancia$Season`
##          diff          lwr          upr p adj
## Seca-Lluvia -0.3303991 -0.4470166 -0.2137816 1e-07
##
## $`MP_Abundancia$Habitat`
##          diff          lwr          upr    p adj
## Oceanico-Costero -0.02728523 -0.1424041 0.08783361 0.6413505
##
## $`MP_Abundancia$Agua`
##          diff          lwr          upr p adj
## Columna de agua-Agua superficial 0.3864818 0.268647 0.5043165 0
## $`MP_Abundancia$Season:MP_Abundancia$Habitat`
##          diff          lwr          upr
p adj
## Seca:Costero-Lluvia:Costero -0.29444832 -0.50113265 -0.0877640 0.00
15523
## Lluvia:Oceanico-Lluvia:Costero 0.01995495 -0.21694342 0.2568533 0.99
63620
## Seca:Oceanico-Lluvia:Costero -0.35413641 -0.56969531 -0.1385775 0.00
01680
## Lluvia:Oceanico-Seca:Costero 0.31440327 0.09497342 0.5338331 0.00
14354
## Seca:Oceanico-Seca:Costero -0.05968809 -0.25588763 0.1365115 0.86
10198
## Seca:Oceanico-Lluvia:Oceanico -0.37409136 -0.60189980 -0.1462829 0.00
01694
##
## $`MP_Abundancia$Season:MP_Abundancia$Agua`
##          diff          lwr
## Seca:Agua superficial-Lluvia:Agua superficial -0.02534832 -0.26911828
## Lluvia:Columna de agua-Lluvia:Agua superficial 0.71060963 0.47262889
## Seca:Columna de agua-Lluvia:Agua superficial 0.12592117 -0.09043313
## Lluvia:Columna de agua-Seca:Agua superficial 0.73595795 0.50847017
## Seca:Columna de agua-Seca:Agua superficial 0.15126949 -0.05348655
## Seca:Columna de agua-Lluvia:Columna de agua -0.58468846 -0.78251686
##          upr          p adj
## Seca:Agua superficial-Lluvia:Agua superficial 0.2184216 0.9932197
## Lluvia:Columna de agua-Lluvia:Agua superficial 0.9485904 0.0000000
## Seca:Columna de agua-Lluvia:Agua superficial 0.3422755 0.4369633
## Lluvia:Columna de agua-Seca:Agua superficial 0.9634457 0.0000000

```

```

## Seca:Columna de agua-Seca:Agua superficial      0.3560255 0.2268008
## Seca:Columna de agua-Lluvia:Columna de agua    -0.3868601 0.0000000
##
## `$MP_Abundancia$Habitat:MP_Abundancia$Agua`
##                                               diff
lwr
## Oceanico:Agua superficial-Costero:Agua superficial -0.01770756 -0.2629
648
## Costero:Columna de agua-Costero:Agua superficial   0.40226459  0.1947
716
## Oceanico:Columna de agua-Costero:Agua superficial  0.34986104  0.1360
387
## Costero:Columna de agua-Oceanico:Agua superficial  0.41997215  0.1934
920
## Oceanico:Columna de agua-Oceanico:Agua superficial 0.36756860  0.1352
760
## Oceanico:Columna de agua-Costero:Columna de agua  -0.05240355 -0.2443
986
##                                               upr      p adj
## Oceanico:Agua superficial-Costero:Agua superficial 0.2275497 0.9976982
## Costero:Columna de agua-Costero:Agua superficial  0.6097576 0.0000054
## Oceanico:Columna de agua-Costero:Agua superficial  0.5636834 0.0001805
## Costero:Columna de agua-Oceanico:Agua superficial  0.6464523 0.0000150
## Oceanico:Columna de agua-Oceanico:Agua superficial 0.5998612 0.0003201
## Oceanico:Columna de agua-Costero:Columna de agua  0.1395915 0.8951783
##

```

Anexo 3. Código del test de aleatorización en lenguaje R.

```

## TEST DE ALEATORIZACIÓN ##
library(readxl)

MP_Abundancia <- read_excel("MP_Abundancia.xlsx", sheet = "En_R_Abundancia")

modelo2 <- aov(MP_Abundancia$Abundance ~ MP_Abundancia$Season*MP_Abundancia$Habitat*MP_Abundancia$Agua*MP_Abundancia$Shape +
               MP_Abundancia$Colors +
               MP_Abundancia$Season*MP_Abundancia$Habitat/MP_Abundancia$Stations)

#Paso 1
summary(modelo2)[[1]][["Pr(>F)"]][1]

## [1] 5.1611e-08

#Paso 2
muestras = list()
for (k in 1:1000) {
  muestras[[k]] = sample(1:nrow(MP_Abundancia), size = 40, replace = T)
}

summary_modelo2 = list()
for (s in 1:1000) {
  summary_modelo2[[s]] = summary(aov(MP_Abundancia$Abundance[muestras[[s]] ~ MP_Abundancia$Season[muestras[[s]]]*MP_Abundancia$Habitat[muestras[[s]]]*MP_Abundancia$Agua[muestras[[s]]]*MP_Abundancia$Shape[muestras[[s]]] + MP_Abundancia$Colors[muestras[[s]]] + MP_Abundancia$Season[muestras[[s]]]*MP_Abundancia$Habitat[muestras[[s]]]/MP_Abundancia$Stations[muestras[[s]]]))
}

summary_modelo2[[1]][[1]][["F value"]][1]

## [1] 2.565936

#Paso 3
valores_p = NULL
for (s in 1:1000) {
  valores_p[s] = summary_modelo2[[s]][[1]][["Pr(>F)"]][1]
}

#Paso 4
quantile(valores_p, 1-0.05)

##          95%
## 0.7115693

modelo <- aov(MP_Abundancia$Abundance~MP_Abundancia$Habitat+
             MP_Abundancia$Season*MP_Abundancia$Colors +

```

```
Error(MP_Abundancia$Season*MP_Abundancia$Habitat))  
summary(modelo2)[[1]][["Pr(>F)"]][1]  
## [1] 5.1611e-08  
quantile(valores_p, 1-0.05)  
##          95%  
## 0.7115693
```