

eman ta zabal zazu



Universidad
del País Vasco

Euskal Herriko
Unibertsitatea

ZIENTZIA
ETA TEKNOLOGIA
FAKULTATEA
FACULTAD
DE CIENCIA
Y TECNOLOGÍA



Gradu Amaierako Lana
Biologian Gradua

**Elgoibarko Hondakin Uren Araztegiaren ur-
efluentearen efektu neurotoxikoen azterketa
kaiioletan mantendutako aingira europarretan
(*Anguilla anguilla*)**

Egilea:

Maddi Garciandia Arcelus

Zuzendaria:

Maren Ortiz Zarragoitia

Zuzendarikidea:

Oihane Diaz de Cerio Arruabarrena

© 2019, Maddi Garciandia Arcelus

Leioa, 2019ko ekainaren 21a

EDUKIEN AURKIBIDEA

LABURPENA	2
ABSTRACT	3
1. SARRERA	4
Helburua.....	8
2. MATERIALAK ETA METODOAK	
2.1. Esperimentuaren diseinua eta laginketa	8
2.2. Laginen homogeneizazioa eta RNA erauzketa	10
2.3. cDNA sintesia	11
2.4. PCR eta elektroforesia	11
2.5. cDNA kontzentrazioaren kuantifikazioa	12
2.6. qRT-PCR bidezko azetilkolinesterasa (<i>AChE</i>) eta triptofano hidroxilasa (<i>TrypH</i>) geneen transkripzio-mailaren analisia	12
2.7. Datuen tratamendu estatistikoa	13
3. EMAITZAK	
3.1. RNAren kalitatearen azterketa	13
3.2. Diseinatutako hasleen anplifikazio proba.....	14
3.3. Garuneko <i>AChE</i> eta <i>TrypH</i> ren transkripzio-mailaren analisia araztegiko hondakin-uren eraginpean	15
4. EZTABAIDA	17
5. ONDORIOAK	20
6. ESKER ONAK	20
7. BIBLIOGRAFIA	20

LABURPENA

Azken hamarkadetan, giza aktibitatearen etengabeko garapenarekin eta mundu mailako populazioaren hazkundearekin, ibai zein beste ur-sistemetara iritsi eta ingurumena kutsatzen duten poluitzaileen kantitatea handituz doa. Hondakin Uren Araztegien (HUA) funtzioa eremu landatar, industria eta hiriguneetatik etorritako ur-zikinetan aurkitzen diren konposatu kutsatzaileak ezabatzea den arren, HUAk, gaur egun, poluzio-iturri nagusiak kontsideratzen dira zenbait ibai-ekosistemetan. Izan ere, araztegietatik etorritako ur-efluenteek bere gain daramatzate nutriente, materia organiko, metal astun eta konposatu psikotropikoen (medikamentu eta droga psikoaktiboak) metabolitoak, besteak beste. Azken horiek organismo bizietan efektu neurotoxikoak sortzen dituzte. Lan honetan Apraitzeko (Elgoibar, Gipuzkoa) HUAko ur-efluentearen eragin neurotoxikoak aztertu dira arrainetan. Horretarako, biomonitorizazio-tresna gisa karioletan sarturiko aingira europarrak, *Anguilla anguilla*, erabili dira, eta neurotoxizitatearekiko sentikorrek diren bi generen, azetilcolinesterasa (*AChE*) eta triptofano hidroxilasa (*TrypH*), transkripzio-maila aztertu da, RT-qPCR bidez. Efluentearen eraginpean egondako aingiretan, kontrol taldearekin alderatuta, bi itu-geneen transkripzio-maila handitzeko joera behatu da, efektu neurotoxikoaren seinale. Gainera, efluentearekiko esposizio-denbora handitzean, *TrypH*ren transkripzio-mailan emendio esanguratsu bat ikusi da. Emaidza horiek iradokitzen dute Apraitzeko HUAtik etorritako ur-efluenteak, arrainengan efektu neurotoxikoak sortzen dituzten konposatu psikotropikoak daramatzala.

ABSTRACT

In the last decades, the amount of pollutants entering rivers via point-sources is increasing along with human population and activity. Although wastewater treatment plants (WWTPs) are built to reduce polluting compounds of sewage coming from rural zones, industry and cities, they are considered as the major point-source pollution in many river ecosystems. In fact, WWTPs effluents consist of complex mixtures of nutrients, organic matter, metals and psychotropic compounds' (pharmaceutical and psychoactive drugs) metabolites, among others. These compounds induce neurotoxic effects in wildlife. In the present study the neurotoxic effects in fishes exposed to Apraiz WWPT (Elgoibar, Gipuzkoa) effluent was analysed. For this aim, European eel, *Anguilla anguilla*, was used as bioindicator and transcription levels of acetylcholinesterase (*AChE*) and tryptophan hidroxilase (*TrypH*) genes in brain were analysed by RT-qPCR as neurotoxicity biomarkers. Eels under the influence of the effluent, comparing with the control ones, showed a trend to increase the transcription-level of both genes, as a sign of neurotoxic effects. Moreover, after one month of exposure *TrypH* transcription-level was significantly increased in eels caged downstream the WWTP effluent. These results suggest that the effluent of the Apraiz WWTP contains psychotropic compounds, which induce neurotoxic effects in fishes.

1. SARRERA

Azken hamarkadetan, giza aktibitatearen etengabeko garapenak, mundu mailako populazioaren igoerak eta baliabideen gehiegizko ustiaketak kutsaduraren emendioa eragin du (Gavrilescu *et al.*, 2015). Gauzak horrela, ibai zein beste ur-sistemetara poluzio-iturri puntaletatik iristen diren kutsatzaile eta nutrienteen kantitatea ere handituz doa (Grimm *et al.*, 2008).

Ura ekosistema naturalen orekarako eta giza aktibitate sozioekonomikoen sostengurako ezinbesteko baliabidea izanik, uraren kalitate ona bermatzea eta hori kutsatzaile kimikoetatik babestea gaur egungo helburu sozial garrantzitsuenetako bat da (Brack *et al.*, 2017; Pelegrín *et al.*, 2019). Konponbidearen zati handiena poluzioaren ekoizpena txikitzea eta hondakin-uren kudeaketa hobeto bat garatzera murrizten da. Izan ere, mundu-mailan hondakin-uren % 80 egokiro tratatu gabe isurtzen da berriz ere ingurumenera (UNESCO, 2017). Horren aurrean, herrialde asko inbertsioak egiten ari dira Hondakin Uren Araztegietan (HUA), horien funtzioa hiri edo industrietatik etorritako ur-zikinen kalitatea berreskuratzea izanik, araztutako urak ibaira edo itsasora berriz ere egoera hobeto batean itzultzea baimentzen baitute (World Health Organization, 2006).

Landa-eremuetako nekazaritza eta abeltzaintza intentsiboaren gorakadak ingurumenean inpaktu handia duten herbizida, ongarririk eta hormonaren erabilerekin emendioa eragin du. Horiekin batera, hiri-eremuetan kontsumitzen diren higie pertsonaleko produktuek, jatorri industrialeko gai kimikoek eta substantzia psikotropikoek (medikamentuak eta droga psikoaktiboak) bizidunengan efektu neurotoxikoak sortzen dituzte (Grandjean eta Landrigan, 2006; Fent *et al.*, 2006; Rice, 2008).

Efektu neurotoxikoak sorrarazten dituzten kutsatzaileak hormona esteroide, antiolitiko, droga antihipertentsibo edota antibiotikoen taldeetan sailkatzen dira orokorrean (Backhaus, 2014; aus der Beek *et al.*, 2016). Droga horien erabilera ez da soilik gizakien kontsumora murrizten, abeltzaintza eta nekazaritza intentsiboan, animalien eta landareen produkzioa industrialara bermatzeko helburuarekin, hormona eta antibiotikoen erabilera ere nabarmena baita. Gauzak horrela, organismo biziak kontsumitutako droga psikotropikoak, bere horretan (alteratu gabeko forma) edo metabolito gisa kanporatuak izan ondoren, hondakin-uretan biltzen dira, zeinak arazketa prozesu ez-efizienteen ondorioz, ibai eta bestelako ur-sistemak kutsatzen dituzten (Vargas eta Ponce-Canchihuamán, 2017).

Hondakin-uren arazte prozesuan bi tratamendu burutzen dira, eta kasu batzuetan hirugarren bat ere izan daiteke: Lehenik, urek aurretratamendu bat jasaten dute, objektu handiak, txikiak eta

gainazaleko koipeak kentzea helburu duena. Ondoren, lehen mailako tratamendua jasaten dute, ahalik eta materia organiko gehien dekantatzeko. Jarraian urari tratamendu fisiko-kimiko ezberdinak egiten zaizkio, eta horren emaitza bi azpiproduktu dira: ur-laginak eta solidoak. Hemendik aurrera, urak eta solidoak tratamendu ezberdinak jasotzen dituzte. Urak bigarren mailako tratamendu batetik pasatzen dira, zeinean mikroorganismo ezberdinak erabiltzen diren materia organikoaren deskonposizioarako. Askotan arazketa prozesua urrats horretan amaitzen da, baina tratamendu tertziarioa burutzen den kasuetan, izpi ultramoreen eta klorazioaren ondorioz metal astunen eta zenbait konposatu kimikoren ezabapena eragiten da (Ros *et al.*, 2018).

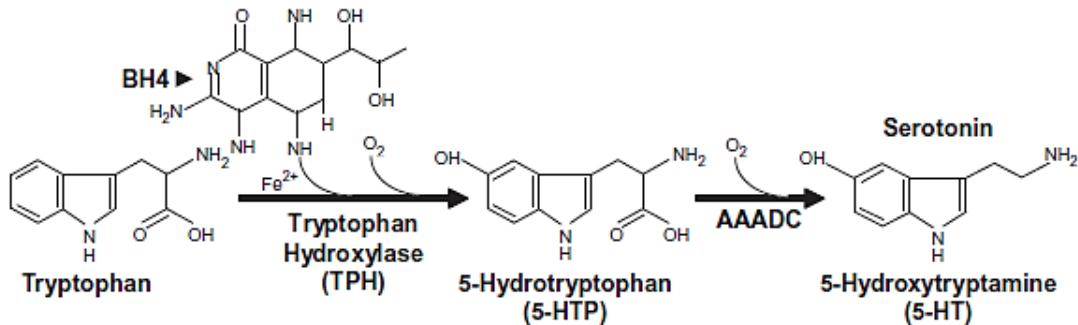
Dena den, HUAak oraindik poluzio-iturri nagusiak dira zenbait ibai-ekosistemetan; izan ere, araztegietatik etorritako ur-efluenteek bere gain daramatzate nutriente, materia organiko, metal astun eta aurrez aipatutako konposatu psikotropikoen metabolitoak (Gros *et al.*, 2007). Konposatu horiek ingurumenera isurtzen direnean, ekosistemako bizidunengan eragin zuzena dute.

Droga psikoaktiboak, produktu farmakologikoekin batera, desorekak sortzen dituzte organismo bizien immunitate-sisteman, ugalketa-sisteman, nerbio-sisteman eta sistema endokrinoan; horrela, efektu kaltegarri nabarmenak sorraziz maila biologikoko guztietan: maila azpizelularretik hasita, zelula, ehun, organo, indibiduo eta populazio mailaraino (Greeraerts eta Belpaire, 2009). Kutsatutako ekosistemetan konposatu neurotoxikoen detekzioarako, azetilkolinesterasa (*AChE*) eta triptofano hidroxilasa (*TrypH*) geneak oso ohikoak diren biomarkatzaileak dira.

Biomarkatzaile horien funtzio biologikoari dagokionez, *AChE*k azetilkolina (*ACh*) neurotransmisorearen hidrolisia katalizatuz, sinapsi kolinergiko baten transmisioa eteten du (Divir *et al.*, 2010). *AChE*ren egitura tridimentsionala dela eta, zenbait kutsatzailek proteinaren gune aktiboko serina batekin lotura kobalente bat eratzen dute, eta horrek, itu-proteinaren inhibizioa induzitzen du (Quinn, 1987).

*TrypH*k kodetzen duen proteina ordea, serotoninaren sintesian jarduten du (Rahman *et al.*, 2011), eta Nerbio Sistema Zentralaren funtzio serotonergikoen mantentzeko garrantzizko rola betetzeaz gain, ugalketa kontrolatzen duen sistema neuroendokrinoan ere funtsezkoa da. Serotoninaren sintesia batez ere garunean ematen da, triptofanoa molekula aitzindaritzat hartuz, *TrypH*k 5-hidrotriptofanoa ekoizten du, eta bertatik, 5-hidrotriptofano deskarboxilasak (AAADC) serotonina (1. Irudia). Gizakietan serotoninaren maila baxua zenbait patologiarekin

lotu da: antsietatea eta depresioarekin, besteak beste. Horiei aurre egiteko farmako ugari errezetatzen dira, eta aurrez aipatu bezala, kontsumitutakoan kanporatzen diren hondakinak ingurumenean dira. Askatzen diren metabolitoek beraz, ekosistema urtarretako organismoetan, serotoninaren adierazpena induzitzen dute (Trudeau *et al.*, 2005), eta horrekin lotuta doanez, baita *TrypH*rena ere.



1. Irudia: Serotoninaren sintesi-prozesuaren azalpen eskematikoa. Iturria: Rahman *et al.*, 2011.

Egungo azterketa ekotoxikologikoez kutsatzaileen efektu biologiko subletalak ikertzen dituzte. Izan ere, poluitzaile gehienek ez dute berehalako heriotza ekartzen; baina, induzitzen dituzten efektuak kaltegarriak dira. Kutsatzaileen toxizitatea, kontzentrazioa eta esposizio-denboraz gain, beste zenbait ingurumen-faktorek eragin zuzena dute sor ditzaketen efektu kaltegarrietan: pHak, Oxigeno kontzentrazioak, tenperaturak eta gazitasunak, besteak beste (Gorokhova *et al.*, 2010). Aipatutako azterketak funtsezkoak dira poluitzaileak haien ingurumen-arriskuaren arabera sailkatuak izan daitezzen. Dena den, kontuan hartu beharra dago indibiduo mailako stres-erantzunak ez direla beti komunitate edo ekosistema mailan erreflexatzen, eta gainera, laborategiko emaitzak ezin direla zuzenean zelaiko ondorioetara transferitu; non elkarrekintza biotikoez eta ingurumenaren konplexutasunak erantzunak modulatu ditzaketen (Souza *et al.*, 2010; Trapp *et al.*, 2014).

Araztegien inpaktua aztertzeke metodo eta estrategia ezberdinak erabiltzen dira. Ur-efluente tratatuek daramatzaten poluitzaileen kontzentrazioa askotan kuantifikazio kimikoaren mugatik beherakoa izaten da. Izan ere, konposatu kutsatzaileak, orokorrean, ng/L-ko kontzentrazioan aurkitzen dira, eta horiek detekzio-mugaren azpitik egon arren, horiekiko esposizioa kronikoa izanik, organismoen egokitasunean eragiten dute eta, ondorioz, epe luzera egoera ekologikoan (Fent *et al.*, 2006).

Araudiaren arabera, HUAetako ur-efluenteek ezin dute toxikoak izan ingurumenera isurtzen direnean, eta horregatik, kutsatzaile kimikoen murrizketaz gain, beharrezkoa da ere bai

bioentseguen bidezko ebaluazio ekotoxikologiko eraginkorragoen erabilera. Izan ere, gaur egun indarrean dauden bioentseguak maiz ez dira nahikoa sentikorrek araztutako uren toxizitatea antzemateko. Gauzak horrela, arreta jartzea komeni da zehatzagoak diren hurbilketak egitea baimentzen dituzten metodoen garapenean (Wigh *et al.*, 2017).

Konposatu organikoen propietate fisiko-kimikoen, beste eragile batzuekin batera, ur-sistemetan eta biotan duten disolbagarritasun-maila determinatzen dute. Gauzak horrela, disolbagarritasuna geroz eta txikiagoa izan, poluitzaileak biotan metatzeko aukerak handitu egiten dira (Ros *et al.*, 2018). Konposatu kimikoen analisirako teknikak aukeratzeko orduan, kontuan hartu beharreko zenbait faktore daude; zehaztasuna, sentikortasuna eta selektiboak izatea, besteak beste. Horretaz gain, oso garrantzitsua da ingurumenarekiko errespetagarria den metodologia hautatzea.

Ur-laginen analisi kimikoen gain, efluentearen eraginpean dauden organismoak ere erabiltzen dira biomonitorizazio-tresnatzat: Algetatik hasita, makroornogabe, muskuilu eta arrainetara (Wickramasinghe *et al.*, 2017; Solagaistua, 2019; Ros *et al.*, 2018). Izan ere, aurretik aipatu den bezala, konposatu kutsatzaile emergenteak kontzentrazio-maila oso baxuetan aurkitzen dira ingurumenean, baina arrainek, adibidez, konposatu horiek metatzeko gaitasuna dutelarik, kontzentrazio-maila altuagoan aurkezten dituzte. Arrainek poluitzaileak elikadura bidez, tegumentutik edota arnasketaren ondorioz barnera ditzakete. Arnasketaren bidez barneratuak izan direnak, zakatzetatik sartu eta odolaren bidez garraiatuz, azkenean, gorputzeko beste organoetan metatzen dira, hala nola, gibelean, garunean, behazunean edota muskuluan.

Araztegien inpaktua aztertzeko biomonitorizazio-tresnatzat animaliak erabiltzekotan, animalia basatiak edota karioletan sartutakoak erabil daitezke (Vieira *et al.*, 2017). Karioletan sartutako espezieekin egindako ikerketek zenbait abantaila dituzte espezie basatiekin alderatuta. Izan ere, ikerketa arearen arabera, espezie basatien laginketa zaila izan daiteke edota lagin kopuruari dagokionez, mugatua. Horretaz gain, karioletan sarturiko estrategia erabiltzeak, esposizio-denbora zehatza jakitea baimentzen du eta, horrela, organismoak ingurumen baldintza berrietara aklimatatzea ekiditen da, fenomeno genetiko eta adaptatiboen influentzia murrizten baita. Gainera, ikerketarako erabilitako organismoen ezaugarriak ezagunak dira (tamaina, adina, sexua, garapen fasea), eta horrek ikerketa area desberdinen arteko konparaketa egitea baimentzen du (Wepener, 2013). Hala ere, animalia basati eta karioletan sarturikoen ikerketa paraleloak ere egiten dira; horri esker, animalien sentikortasuna eta adaptazio-mekanismoei buruzko informazioa lortzen da (Vieira *et al.*, 2017).

Lan honetan Apraitzeko (Elgoibar, Gipuzkoa) Hondakin Uren Araztegiko ur-efluentearen eragin neurotoxikoak aztertu dira arrainetan. Horretarako, biomarkatzaile gisa karioletan sarturiko aingira europarrak, *Anguilla anguilla*, erabili dira.

Aingirak konposatu xenobiotiko lipofilioak metatzeko joera dute. Askotan sedimentu kutsatuetan bizi dira eta arnasketaren ondorioz, elikaduraren bitartez edota tegumentutik, konposatu kutsatzaileak bereganatu eta kontzentrazio-maila altuan aurkezten dituzte. Itsasoan jaiotzen diren arren, fase heldugabeen ibaietara migratzen dute, eta bertan bizi dira denbora luzez (bataz bestez 6-9 urtez) (Vollestad, 1992). Denbora horretan zehar konposatu xenobiotikoen bioakumulazioa gertatzen da eta, beraz, kontzentrazio-mailak handituz doaz adinarekin batera. Hala ere, aingira heldugabeak arrain erresistenteak direla kontsideratzen da, baldintza txiroko uretan bizirauteko gaitasuna azaltzen baitute, eta baita poluitzaile ugariarekin kutsatutako uretan bizitzekoa ere (Greeraerts eta Belpaire, 2009).

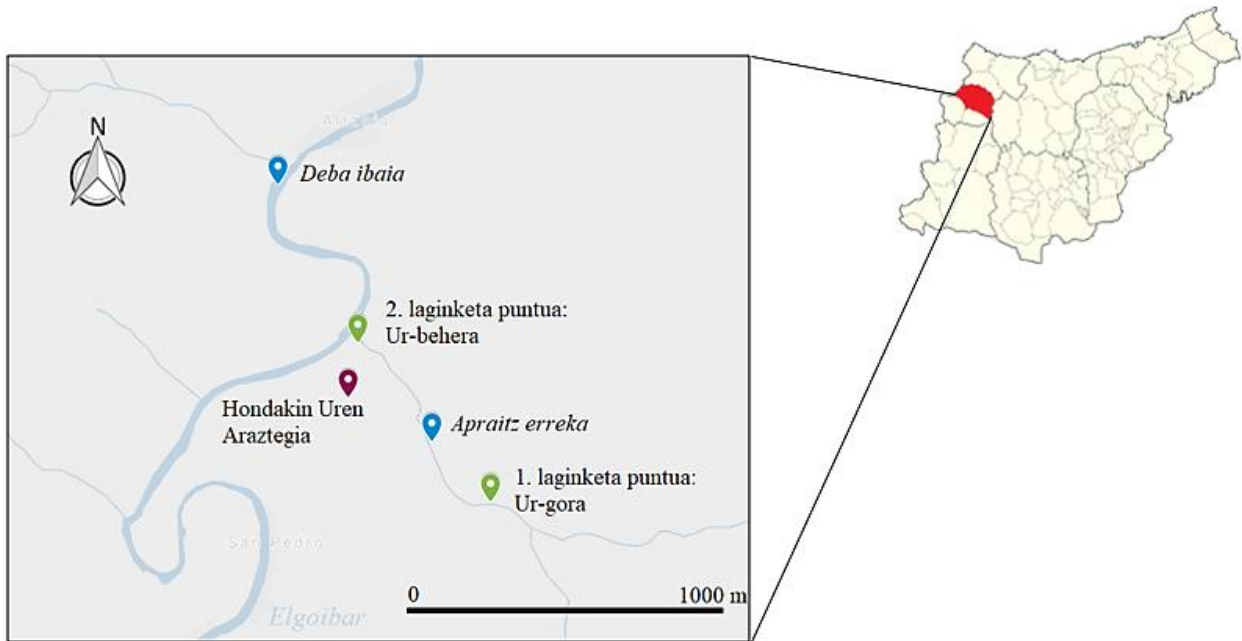
Helburua

Lan honen helburu nagusia izan da Elgoibarko HUAren ur-efluentearen eragin neurotoxikoak azterzea Apraitz errekan karioletan mantendutako aingiretan. Analisia egiteko aingiren garuneko *AChE* eta *TrypH* geneen transkripzio-maila neurtu da RT-qPCR bidez.

2. MATERIALAK ETA METODOAK

2.1. Esperimentuaren diseinua eta laginketa

Hautatutako HUA (Apraitz) Elgoibarren kokatuta dago (43°13'41" I 2°23'56" E) (2. Irudia). Araztegi horrek hirietako hondakin-urak zein industrialak tratatzen ditu, eta kutsadura zama 85.000 biztanle baliokideri dagokiona da. Jatorria bertan zuen ur-efluente bat Deba ibaira bideratu zen, Apraitz errekaarekin bat egiten duen gunera, hain zuzen. Isurketa 2 orduro, 20-40 minutuz egiten zen, bataz besteko $11,4 \text{ m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$ -ko emariarekin (Solagaistua, 2019). Isurketa puntua kontuan hartuta bi laginketa estazio finkatu ziren: isurketatik ur-gora (kontrola) eta isurketatik ur-behera (inpaktua). Horietako bakoitzean aingirak karioletan sartu ziren (3. Irudia).



2. Irudia: Elgoibarreko (Gipuzkoa) Apraiz Hondakin Uren Araztegia, Deba ibaia eta Apraiz erreka eta laginketa estazioak mapan markatuta.

Ikerketan erabilitako aingirak ACAAP (Asociación Cofradía de Amigos de la Anguila del Pas; Suances, Cantabria) elkartearen haztegia lortu ziren, guztira, 57 aingira heldugabe. Horietatik sei zuzenean bereiztu egin ziren ondorengo diseziorako (T0). Gainontzekoak karioletan sartu ziren aipatutako bi laginketa puntuetan banatzeko.

Kaiolak (3. Irudia) aldez aurretik aingirekin erabiliak izan dira beste proiektu batean, eta beraz, horrelako esperimentuetarako egokiak zirela jakina zen.

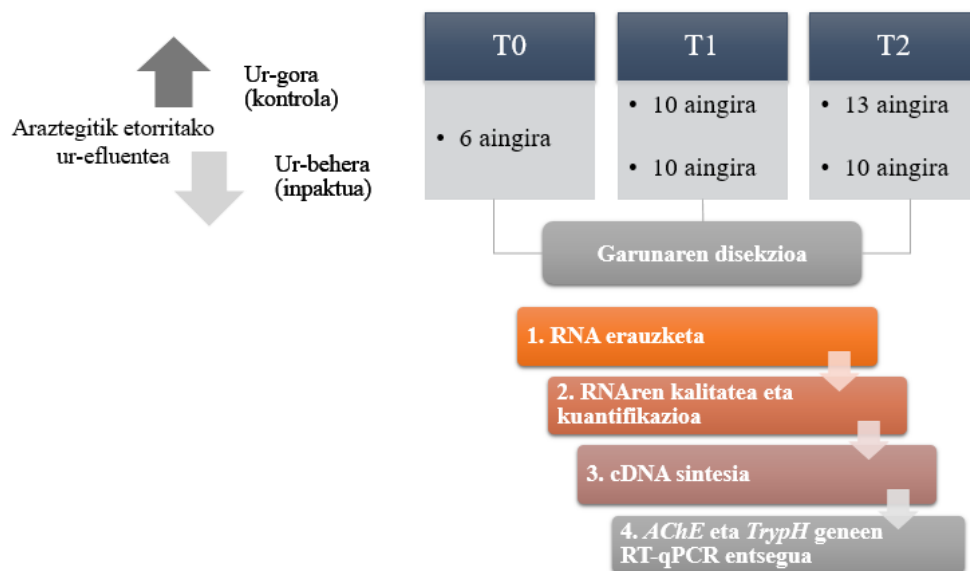


3. Irudia: Laginketa-estazio bakoitzean kokatutako kaiola eta esperimentuan erabilitako aingirak. Kaiolaren dimentsioak: 356×256×107mm.

Aingirak astebetez erreka baldintzapean egon ostean, lehenengo laginketa egin zen (T1): 10 aingira hartu ziren ur-gora kokatutako kaiolatik (kontrola) eta beste 10 ur-behera kokatutako

kaiolatik (inpaktua). Lau astetara bigarren laginketa egin zelarik (T2), karioletan biziraun zuten aingira guztiak hartu ziren: 13 aingira ur-gora eta 10 aingira ur-behera.

Aingiren esperimentazioak eta manipulazio prozedura guztiek UPV/EHUko Animalien Esperimentaziorako Etika Batzordearen eta Gipuzkoako Foru Aldundiaren oniritzia zeukaten. Aingirak Plentziako itsas Estaziora (PiE-UPV/EHU) garraiatu ziren jatorriko uretan murgilduta. Heltzerakoan, benzokaina soluzio saturatuan sartu ziren anestesiatzeko eta, ondoren, arrainak neurtu eta pisatu, eta dekapitazioz sakrifikatu ziren. Jarraian garunaren disezioa egin zen, eta RNAlater™ Stabilization Solution-ean (Ambion) murgildurik -80°C-tan gorde ziren prozedurarekin jarraitu arte. Ondoren, laginak homogeneousatu eta horietatik RNA erauzi zen. Erauzketen kalitatea eta RNA kontzentrazioa neurtu eta ondoren, cDNAren sintesiari ekin zitzaion. Jarraian, qRT-PCR bidezko azetilkolinesterasa (*AChE*) eta triptofano hidroxilasa (*trypH*) geneen transkripzio-mailaren analisisia egin zen eta, azkenik, eskuratutako datuen tratamendu estatistikoekin emaitzen adierazgarritasuna frogatu zen (4. Irudia).



4. Irudia: Diseinu esperimentalaren azalpen eskematikoa.

2.2. Laginen homogeneousazioa eta RNA erauzketa

Animalia bakoitzetik garunaren 50-100 mg disezionatu ziren RNA erauzteko. Lehenik, Precellys 24 erabiliz (Bertin Technologies, Montigny-le-Bretonneux, Frantzia) (2 x 6500 rpm, 15'') laginak 1 mL TriZol® Reagent-ean (Invitrogen, Carlsbad, California, USA) homogeneousatu ziren. Laginak -80°C tan gorde ziren RNA erauzketa egin zen arte, eta erauzketarako fabrikatzailearen argibideak jarraitu ziren.

Lagin bakoitzeko RNA kontzentrazioa kuantifikatzeko 2 μ L lagin 98 μ L RNase *free* uretan diluitu ziren eta espektrofotometroan 260/280 nm eta 230/260 nm-ko luzerako uhinen absorbantzia neurtu zen.

Horrez gain, laginen RNA kalitatea eta degradazio maila aztertzeko 2100 Agilent Bioanalyzer System erabiliz, kapilaritate bidezko elektroforesia egin zen, fabrikatzaileak Agilent RNA 6000 Nano Assay protokoloan (Agilent Technologies, Waldbronn, Alemania) adierazitako urratsak jarraituz.

2.3. cDNA sintesia

Garunetatik erauzitako RNA cDNA sintetizatzeke erabili zen. First-Strand cDNA Synthesis protokoloa jarraituz (Agilent Technologies), lagin bakoitzeko RNA totalaren 0,45 μ g erabili ziren cDNA prestatzeko, 20 mL-ko bolumen totalan.

2.4. PCR eta elektroforesia

Itu-geneen hasleen espezifikotasuna frogatzeko sekuentzia horien amplifikazioak egin ziren PCR bidez. Itu sekuentzien amplifikaziorako, molde gisa beste ikerketa proiektu baterako aurrez sintetizatuta eta -80°C-tan gordeta zegoen aingiren garuneko cDNA erabili zen, eta Taq DNA Polymerase recombinant Kit-a (Invitrogen) eta 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems, Carlsbad, California, USA) termoziklagailuaz baliatuz egin zen. Termoziklagailua ondorengo pausuekin programatu zen: aktibazioa 94°C-tan 2 minutuz; ondoren, 35 ziklo desnaturalizazioarekin hasiz, 94°C-tan 30 segundo; hibridazioa 30 segundoz hasleen fusio-temperaturan (T_m) (1. Taula); eta, elongazioa 72°C-tan 30 segundoz. Amaitzeko, 7 minutuz 72°C.

PCR produktuak elektroforesi bidez aztertuak izan ziren etidio bromuroaz tindatutako %2ko agarosazko gel batean.

1. Taula: PCR eta qPCR analisietan erabilitako hasle-pareak (Forward eta Reverse) eta bakoitzaren fusio-temperaturak (T_m).

	Fw (5'-3')	Rv (5'-3')	T_m (°C)
<i>AChE</i>	GGAGGTACCTGGCCTACACA	ACCTGCGCTCTCTCCAATA	60
<i>TrypH</i>	ACAGCTTTGAAGAGGCCAAAGTC	TTGAGTGCATCACCCACAATGTC	60

2.5. cDNAREN kontzentrazioaren kuantifikazioa

Kate bakarreko cDNA (sscDNA) kontzentrazioa kuantifikatu zen QuantiT™ OliGreen® Kit (Life Technologies™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) erabiliz eta fabrikatzailearen argibideak jarraituz. Lehenik, bost puntuko kurba estandarra eratu zen. Horretarako, M13 oligonuklotidoaren (Corning Incorporated, Corning, New York, USA) kontzentrazio jakineko diluzio ezberdinak prestatu eta horietako bakoitzari 50 µL Quant-iT™ OliGreen® errektiboa gehitu zitzaien. Disoluzioa nahastu, eta 2-5 minutuz iluntasunean inkubatu zen giro tenperaturan. Laginen fluoreszentzia Synergy HT Multi-Mode Microplate Reader (Biotek, Winoosky, USA) fluorimetroarekin neurtu zen, kitzikapen eta igorpenaren uhin-luzera 480 nm eta 520 nm-takoa izanik, hurrenez hurren. Prozedura berdina jarraitu zen laginen cDNArekin. Lehenik laginak diluitu ziren nukleasa *free* ur distilatuan 50 µL-ko bolumen totallean, eta horri errektiboa gehitu zitzaion (beste 50 µL). Azkenik, cDNAREN benetako kontzentrazioa kalkulatzeko, zuriaren fluoreszentzia balioa kendu zitzaien lagin guztiei.

2.6. qRT-PCR bidezko *TrypH* eta *AChE*ren transkripzio-mailaren analisisa aingiren garunean

Efektu neurotoxikoarekiko sentikorrak diren *TrypH* eta *AChE* geneen (Rahman *et al.*, 2011; Matozzo *et al.*, 2005) transkripzio-mailaren analisisa egin zen garuneko lagin guztietan. qPCR anplifikazioak 20 µL-ko bolumen totallean egin ziren, eta horietatik, 2 µL cDNA diluitua (1:3 *TrypH* generako eta 1:30 *AChE* generako) eta 10 µL FastStart Universal SYBR Green Master Mix (Rox) (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). Hasleen kontzentrazio egokiena determinatzeko cDNAREN diluzio desberdinekin qPCR analisi bat egin zen.

Esperimentuan 96-putzuko erreakzio plakak erabiliz, lagin bakoitzeko hiru erreplika egin ziren, eta anplifikaziorako 7300 Real-Time PCR System termoziklagailua (Applied Biosystems) erabili zen. Termoziklagailuak jarraitutako urratsak ondorengoak izan ziren: aktibazioa 50°C-tan 2 minutuz eta 95°C-tan 10 minutuz. Ondoren, 40 ziklo egin ziren, desnaturalizazioarekin hasiz, 95°C-tan 15 segundoz eta hasleen fusio-tenperaturarekin (T_m) jarraituz, 60°C-tan minutu batez. Azkenik, disoziazio fasea gehitu zen, 95°C-tan 15 segundo, fusio-tenperaturan (60 °C) minutu bat, eta amaitzeko 95°C-tan 15 segundo.

Gene bakoitzaren anplifikazioaren efizientzia kurba estandar batetik abiatuta estimatu zen. Horretarako, cDNAREN diluzio seriatuen anplifikazioa egin zen (10, 25, 50, 100-eko diluzio faktoreekin), eta ondorengo ekuazioak aplikatu ziren:

$$Efizientzia = 10^{\left(-\frac{1}{slope}\right)}$$

Lortutako balioetatik, Rojo-bartolomé *et al.* (2016) jarraituz, Efizientiaren zuzenketa (Ef. zuzenketa) kalkulatu zen ΔCt metodoaz baliatuta. Amaitzeko, gene bakoitzaren kantitate erlatiboa kuantifikatu zen (RQ, *Relative Quantity*) lagin bakoitzerako.

$$\Delta Ct = X Ct - intercept$$

$$Ef. zuzenketa = Efizientzia^{\left(\frac{\Delta Ct}{[cDNA]}\right)}$$

$$RQ = \frac{Ef zuzenketa}{Ef zuzenketaren Bb}$$

2.7. Datuen tratamendu estatistikoak

Analisi estatistikoak SPSS softwarearekin (IBM SPSS Statistics for Windows, Version 25.0) egin ziren. Datuak testatu ziren banaketa normala jarraitzen ote zuten frogatzeko. Banaketa normala ez zutenez, proba ez-parametrikokoak egin ziren; Kolmogorov-Smirnoff eta Kruskal-Wallis-en testak, hain zuzen ere. Adierazgarritasuna $p < 0,05$ balioan ezarri zen.

3. EMAITZAK

3.1. RNAREN kalitatearen azterketa

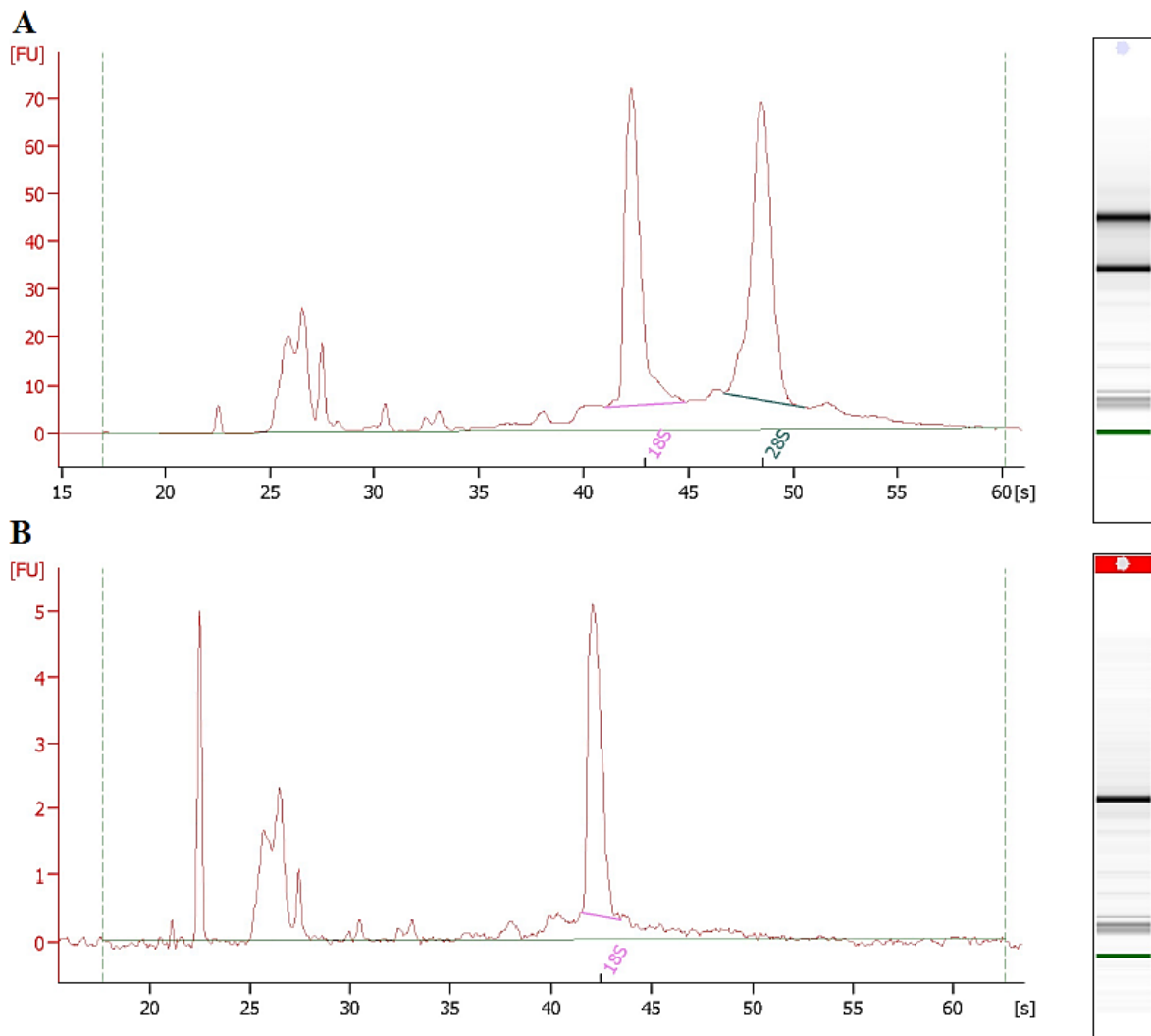
Aingiren burmuinetik erauzitako RNAREN kalitatea eta degradazio maila 2100 Agilent Bioanalyzer System entseguaren bidez aztertu da. Erauzketak 9ko RIN (*RNA Integrity Number*) balioarekin egin dira, kalitate oneko erauzketak direla adierazten duelarik.

RNA laginak mikrotxipean elektroforetikoki banatu eta detekzio fluoreszentearen bitartez antzematen dira. Degradazio maila aztertzeko, 2100 Agilent Bioanalyzer sistemak RNA erribosomikoaren azpiunitate handia osatzen duten 18S eta 28S domeinuak neurtzen ditu. Ikertutako laginetan bi patroi ezberdin ikusi dira (5. Irudia): Lagin batzuetan esperotako bi pikoak (18S eta 28S rRNAREN adierazgarri) ageri dira; eta besteetan, aldiz, soilik 18S rRNARENA (2. Taula). Kasu horietan 28S rRNA domeinua zatikatu egin da.

Aingira guztiak kontuan hartuta, 36 laginetan bi domeinuak aurkitzen dira, eta 11 laginetan soilik 18S domeinua. Laginketa-puntuaren arabera sailkapena eginez, ikus daiteke nola ur-gora kokatutako aingiretan 18S rRNA soilik aurkezten duten lagin gehiago daudela, ur-beherakoekin alderatuta.

2. Taula: Egun eta laginketa-puntu bakoitzeko aingirek aurkeztutako RNA erribosomikoa (28S eta 18S rRNA).

	18S eta 28S rRNA	18S rRNA
T0	4 lagin	1 lagin
T1 ur-gora	6 lagin	4 lagin
T1 ur-behera	9 lagin	1 lagin
T2 ur-gora	9 lagin	3 lagin
T2 ur-behera	8 lagin	2 lagin

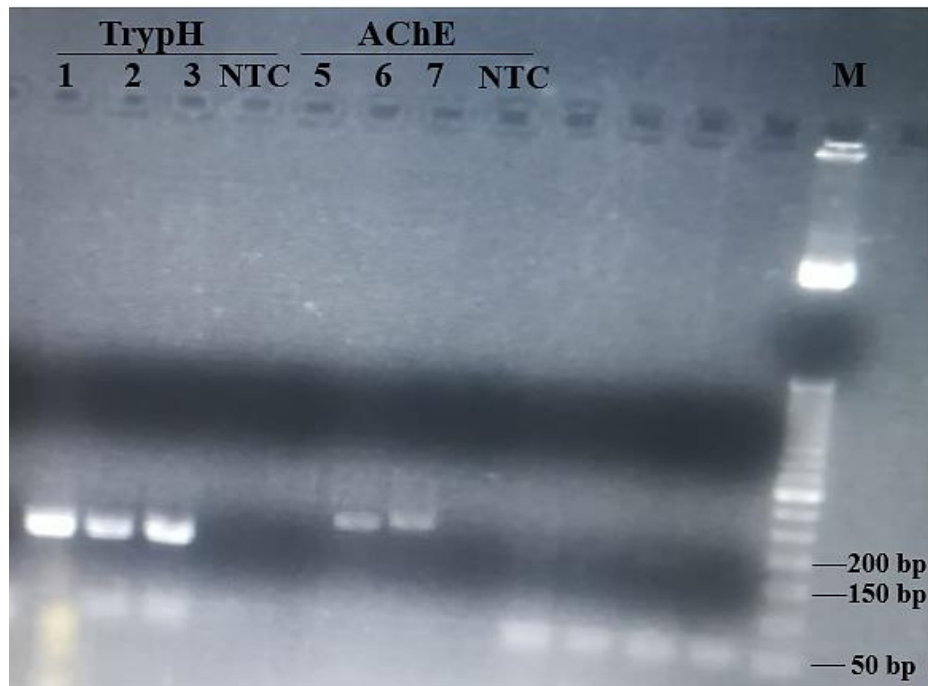


5. Irudia: Garunetik erauzitako RNAREN elektroferogramak. Bi irudietan, lehenengo pikoak (20-25 segundoen artean) markatzaileari egiten dio erreferentzia. 25-30 segundo tartea 5S rRNAREN eskualdea da. A laginean 18S eta 28S rRNA agertzen dira, eta B laginean 18S rRNA soilik.

3.2. Diseinatutako hasleen amplifikazio proba

Hasleen itu-sekuentziekiko espezifikotasuna frogatzeko egindako PCR bidezko amplifikazioan lortutako produktuak elektroforesian aztertzean, banda bakarrak lortu dira (6. Irudia). Hasle-

pare bakoitza (*Fw* eta *Rv*) indibidualki erabiliz (*TrypH*renak eta *AChE*renak, kale ezberdinetan, alegia) eta, molde gisa beste ikerketa proiektu baterako aurrez sintetizatuta eta -80°C -tan gordeta zegoen aingiren garuneko cDNA $3\ \mu\text{g}$ erabiliz, hasleak $60\ ^{\circ}\text{C}$ -ko fusio-tenperaturan (T_m), *TrypH*, eta bai *AChE*rekiko espezifikoak direla frogatu da.



6. Irudia: *TrypH* eta *AChE* geneen hasleak probatzeko egindako PCRaren produktuen elektroforesia, etidio bromuroaz tindatutako %2-ko agarosazko gelean. “M” hizkiarekin adierazitako kalean markatzailea (50 bp ladder); 1-3 kaleetan *TrypH*rekiko espezifikoak diren hasleak erabiliz lortutako PCR produktuak eta 4. kalean *TrypH*ren kontrol negatiboa (NCT); 5-7 kaleetan *AChE*rekiko espezifikoak diren hasleak erabiliz lortutako PCR produktuak 8. kalean *AChE*ren kontrol negatiboa (NTC). Beste kaleetan hasle ezezagunekin ekoiztutako produktua kargatu zen.

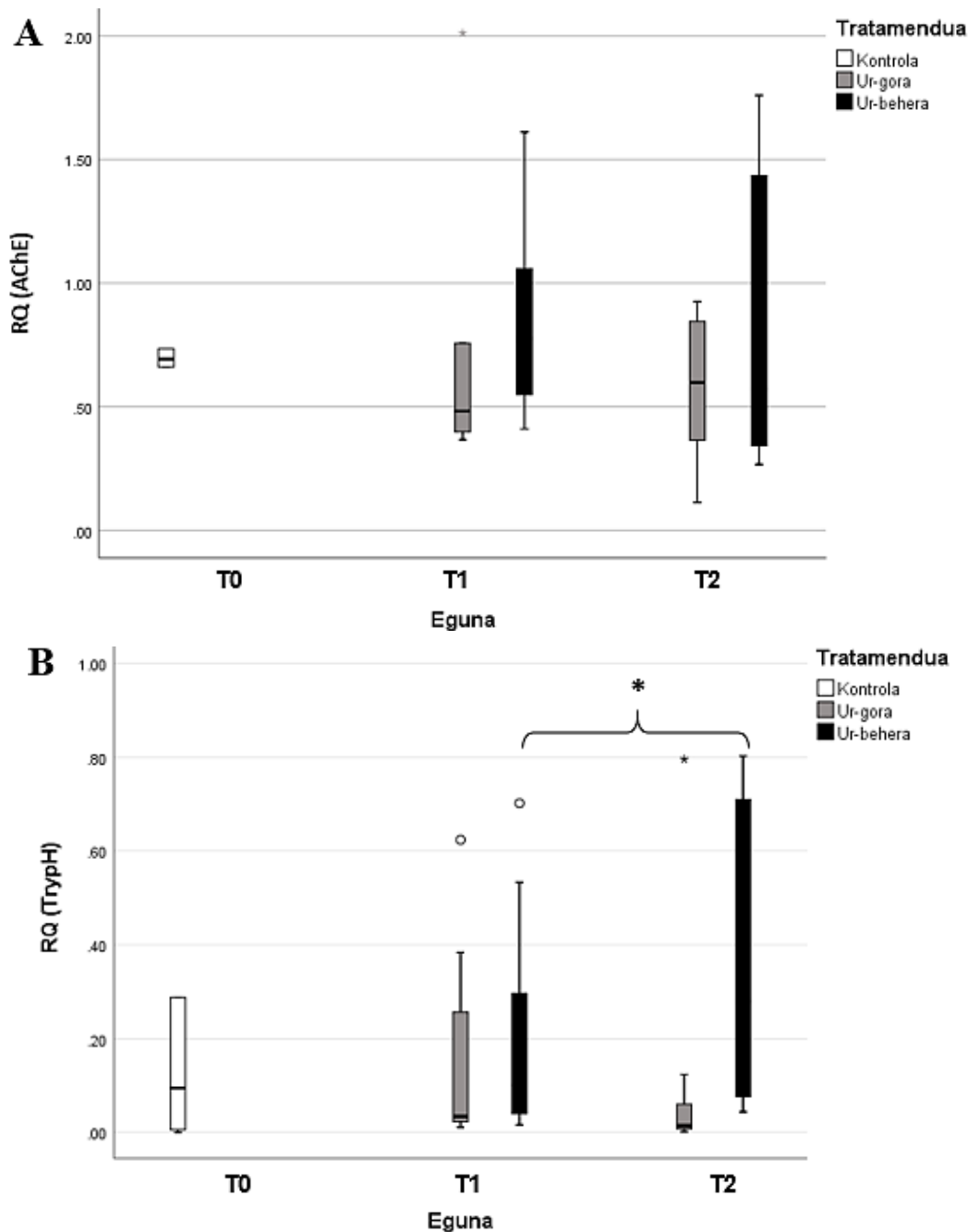
Hasleak PCR arruntarekin probatuta, qPCR analisisetarako sekuentzien espezifikotasuna bermatzea lortu da.

3.3. Garuneko *AChE* eta *TrypH*ren transkripzio-mailaren analisia araztegiko hondakin-uren eraginpean

AChE eta *TrypH* geneak aingiren garunean adierazi egiten direla ikusi da. Bi itu-geneen transkripzio-mailak laginketa-puntuaren eta laginketa-egunaren arabera aldatu egin dira. T1 eta T2 laginetako *AChE* gainadierazi egin da T0 eguneko laginekiko. Horretaz gain, gainadierazpen joera bat ikus daiteke ur-beherako aingiretan ur-gorakoekin alderatuta (7A irudia), baina desberdintasunak ez dira esangarriak ($p>0,05$).

*TrypH*ren kasuan, T0 eta T1 eguneko ur-gorako balioak nahiko antzeko mantendu dira. Egun bakoitzean (T1 eta T2) ur-gorako eta ur-beherako aingiren transkripzio-maila alderatzean,

gainadiaerazpenerako joera garbia ikus daiteke (7B irudia), dena den, horien arteko desberdintasunak ez dira esangarriak ($p>0,05$). T2 eguneko ur-gorako aingiretan genearen azpierreulazioa beha daiteke. T1 eta T2 egunetako ur-beherako laginak alderatuta *TrypH*ren gainadierazpena eman dela ikusi da (7B irudia), esangarria den aldaketarekin ($p<0,05$).



7. Irudia: Azetilcolinesterasa (AChE) eta triptofano hidroxilasa (TrypH) geneen adierazpen erlatiboa (RQ), egun (T0, T1 eta T2) eta laginketa-estazio (ur-gora eta ur-behera) bakoitzean, box-plot grafikoetan irudikatuta. Kutxa beltzak ur-beherako laginei dagozkie eta kutxa grisak ur-gorakoei; txuriz, kontrol taldea (T0 eguneko) irudikatu da. Kutxek datuen % 25-75eko banaketa biltzen dute, eta biboteekin datuen % 95ekoa. Puntu hutsak eta asterisko txikiak muturreko datuak dira. Giltza eta asteriskoak (*) talde esperimentalen arteko desberdintasun esanguratsua adierazten du (Kruskal-Wallis test. $p<0,05$).

Orokorrean, qPCR analisisien emaitzak normalizatzeko erreferentziazko edo *housekeeping* deritzon geneak erabiltzen dira, horien adierazpena aldatu gabe mantentzen dela onartzen baita. Ikerketa hau bezalako kasuetan ordea, aldaketa bortitzak jasaten dituzten ehunak erabiltzen dira (garuna kasu) eta, ondorioz, RNA edukia eta konposizioa ere aldatu egiten dira. Gauzak horrela, Rojo-Bartolomé eta kolaboratzaileek (2016) dioten moduan, ez dago erabilgarria den erreferentziazko generik. Zenbait ikerlarik qPCRko datuak cDNA kopuru totalarekiko normalizatzea proposatu dute (Libus eta Štorchová, 2006; Mittelholzer *et al.*, 2007), Δ CT metodoan oinarrituta. Ikerketa horiekin ondorioztatu da normalizazio metodo honekin baliozko emaitzak lortzen direla erreferentzia geneak adierazpen egonkorra ez duten ehun dinamikoak ikertzerakoan (Rojo-Bartolomé *et al.*, 2016)

4. EZTABAIDA

Inguru-landatarretako eta hiriguneetako konposatu psikotropikoen kontsumoa azken urteotan emendatu egin da mundu mailako populazioaren igoerarekin batera (Van Boeckel *et al.*, 2014). Hori eta HUAen efizientzia mugatua kontuan hartuta, ingurumena kutsatzen amaitzen duten poluitzaileak anitzak dira (Gros *et al.*, 2007). Izan ere, HUAk giza-kontsumoko produktu farmakologikoei dagokienez, ur-kutsaduraren poluzio-iturri nagusiak kontsideratzen dira.

Ekosistema urtarretako bizidunetan konposatu psikotropikoek (farmako eta droga psikoaktiboak) efektu neurotoxikoa sortzen dute (Vargas *et al.*, 2017). Hori abiapuntutzat hartuz, lan honetan Apraitzeko (Elgoibar) HUAko ur-efluentearen eraginpean aste betez (T1) eta bost astez (T2) egon diren karioletan sartutako aingiretan neurotoxizitatearekiko sentikorrak diren bi biomarkatzaile aztertu dira: *AChE* eta *TrypH*. Lortutako datuekin, bi geneetan gainadierazpenerako joera bat behatu da ur-beherako aingiretan (efluentearen eraginpean daudenak), ur-gorakoekin eta T0 egunekoekin alderatuta.

*AChE*ri dagokionez, adierazpen erlatiboaren (RQ) aldaketa nabariena T1 eta T2 egunetako ur-beherako laginetan aurkitzen da. Nahiz eta ez izan desberdintasunak esangarriak ($p > 0,05$), joera bat ikusten da, zeina ez datorren bat efektu neurotoxikoa duten konposatuen eraginpean dauden arrainen ohiko erantzunarekin. Funtzio kolinergikoen beherakada gertatuz gero (konposatu psikotropikoen efektu neurotoxikoaren ondorioz), *AChE*ren transkripzioa ere gutxitu egin beharko litzateke. Beraz, emaitza hauekin ezin da efluentearen neurotoxizitatea ziurtatu. Atunes eta kolaboratzaileek (2016) egindako ikerketan benzalkonio kloruroak (bakterizida, desinfektatzailea eta zenbait produktu farmazeutikoen osagai dena) funtzio kolinergikoan duen efektu neurotoxikoa aztertu zuten esposizio kronikoan zeuden ortzadar-

amurrainetan, eta *AChE*ren aktibitatearen emendioa behatu zen. Aldiz, beste ikerketa askotan *AChE*ren aktibitatea, ur-efluentetan topa daitezkeen konposatu kutsatzaileen ondorioz, inhibitua geratzen dela adierazten dute (Peña-Llopis *et al.*, 2003; Fulton eta Key, 2001; Williams *et al.*, 2011; Kristofco *et al.*, 2015).

Gauzak horrela, konposatu kutsatzaile horiek eragiten dituzten efektuak, eta batez ere organismo urtarretan, ez dira beti koherenteak izaten, ezta aztertzeko errazak ere (Antunes *et al.*, 2016). Orain arte aipatu den bezala, kasu batzuetan inhibizioa gertatzen da, beste ikerketa batzuek ordea efekturik eza aurkeztu dute (Nunes *et al.*, 2005). Beraz, konposatu kutsatzaile emergenteek mota guztietako erantzunak eragin ditzaketela ikusi da, bereziki nahasketan agertzen direnean, araztegiako efluenteen kasu.

TrypHri dagokionez, transkripzio-mailan emendio esanguratsu bat ($p < 0,05$) behatu da lehenengo laginketa egunean eta bigarrenean hartutako ur-beherako aingiren artean. *TrypH* serotoninaren sintesian jarduten duen entzima izanik, efektu neurotoxikoak sortzen dituzten konposatuen eraginpean egonik, eta gainera bestelako egoera estresagarri fisikoen pean (kairoletan sartuta, mugikortasun murriztua, ...) ugaztun eta espezie teleosteoetan (aingira), serotoninaren kontzentrazioa emendatzen dela ikusi da, eta horrekin batera *TrypH*rena (Rahman *et al.*, 2011)

Konposatu kimikoen toxizitatea, orokorrean, horien aktibitate biologikoarekin erlazionatuta dago. Izaera lipofilikoak, mintz-iragazkortasun handia edukitzeak eta bereizgarriak ez diren metabolitoen eraketak ingurumenean haien presentzia iraunkorra izatea eragiten du (Antunes *et al.*, 2016). Hori, eta aingirek konposatu xenobiotiko lipofilikoak metatzeko joera dutela kontuan hartuta, *TrypH*ren denboran zeharreko aldaketa uler daiteke. Izan ere, T2ko aingirak T1ekoak baino hilabete bat gehiago egon dira araztegiako ur-efluentearen eraginpean, eta ondorioz, T2 eguneko ur-beherako aingiretan konposatu psikotropikoak kontzentrazio-maila altuagoan aurkitzea zentzuzkoa litzateke.

*TrypH*rekin jarraituz, esan beharra dago T2ko ur-gorako aingirak T0 eta T1eko ur-gorakoekin alderatuz, itu-genearen azpiadierazpen nabaria behatu dela. Ur-gora kokatutako kairoletan egon diren aingirek konposatu psikotropikoen eraginik izan ez dutela onartuz, bestelako estres baldintzak jasan dituztela kontuan hartu behar da: aingiren maneia, mugikortasun eza, kaiolan indibiduo askoren presentzia... Horiek, ordea, lehenengo laginketaren ostean, murriztu egin ziren; kairoletan indibiduo gutxiago egonik, mugikortasuna handitu eginen baita. Horretaz gain, baliteke aklimatatzeko denbora nahikoa pasa izana.

Alde batetik, faktore estresagarrien murrizketak, serotoninaren sintesian eragina du, horren kontzentrazioa jaitsiz, hain justu (Rahman *et al.*, 2011). Bestalde, aipatutako aingiren aklimatatzeko gaitasuna frogatzeko, Smolders eta kolaboratzaileek (2003) dioten moduan, animalia basatien eta kaiioletan sarturikoen ikerketa paralelo bat egitea komenigarria litzateke. Horrela, emaitzak alderatu eta ingurumen jakineko baldintzetara adaptatzeko gaitasuna aztertzea posiblea izanik (Vieira *et al.*, 2017).

Lan honetan aingiren garuneko RNA kalitatearen analisia ere egin da, eta espero ez ziren bi profil desberdin behatu dira emaitzetan. Erauzitako RNAREN integritatea bermatzeko metodo ohikoena zeluletan ugaritasun handiz ekoizten den RNA erribosomikoaren (rRNA) bandak aztertzeke egiten den gel elektroforesia da. Zehazki, rRNAREN azpiunitate handia aztertzen da, 18S eta 28S domeinuek osatzen dutena. Gauzak horrela, rRNAREN integritateak gainontzeko RNARENA erreflexatzen duela onartzen da (Winnebeck *et al.*, 2010).

Lortutako emaitzetan zenbait aingirek soilik 18S rRNA aurkeztu dutela ikusi da. Espero ez zen profil hori 28S rRNAREN zatiketaren ondorio da. Alde batetik, Li eta Pestkak (2008) haien ikerketa batean azaltzen dute jatorri natural zein sintetikoa duten erribotoxinek 28S rRNAREN zatikapena indusitzen dutela, eta sortzen diren zatiak 18S rRNAREN eskualdera desplazatzen direla (elektroforesian). Erribotoxinak edo proteina erribosoma-inaktibatzaileak (*Ribosome-inactivating proteins, RIPs*) landare, onddo edota bakterioek ekoizten dituzte naturalki (Kao eta Davies, 1995; Olmo *et al.*, 2001; Hartley eta Lord, 2004). Horiez gain, estres erribotoxikoa ere antibiotikoen sor dezakete, baita erradiazio ultramoreak ere (Li eta Pestka, 2008). Gauzak horrela, pentsa zitekeen efluenteak zeramatzan kutsatzaile nahasketak eta ingurune naturaletik etorritako erribotoxinek eragin nabariagoa izango luketela ur-beherako aingiretan. Emaitzetan, ordea, ez da hori erreflexatzen; izan ere, ur-beheran, aingira gutxiagotan ikusi da piko bakarreko ereduak. Hau da, ikusitako bi profilek ez dute erlaziorik azaldu ur-gora edo ur-behera kokatuta egotearekin. Bestalde, ikerlari batzuek (Fan *et al.*, 1999) 28S rRNAREN presentzia eza garuneko traumatismoekin lotu dute.

Dena den, litekeena da laginen prozesamenduan, homogeneizazioan edota RNAREN erauzketan bertan, lagin batzuetatik bestera baldintzak aldatu izana. Izan ere, lagin guztiak ez ziren aldi berean prozesatu, eta urrats berak jarraitu arren, tenperatura aldaketa txikiak gerta daitezke, zeinak RNAREN integritatean eragina duten. Winnebeck eta kolaboratzaileek (2010) diotenez, laginen beroketak 28S rRNA zatikatzea eragiten du, eta sortzen diren zati berriak partzialki 18S rRNAREkin agertzen dira.

5. ONDORIOAK

Lan esperimental honetan Apraitzeko Hondakin Uren Araztegiko ur-efluentearen efektu neurotoxikoa aztertu da, aingira europarrak biomonitorizazio-tresna gisa erabilia. Aingiren garuneko *TrypH* eta *AChE* geneen transkripzio-maila aztertuz, efluentearen eraginpean zeuden arrainetan adierazpena handitzeko joera behatu da. Gainadierazpen hori HUAren hondakinekiko esposizio-denbora luzatzean esanguratsua bilakatu da *TrypH*ren kasuan. *AChE*k, ordea, joera berbera izan arren, ez du estatistikoki esanguratsua den aldaketarik jasan. Gauzak horrela, Apraitzeko araztegiak arazten dituen uretan efektu neurotoxikoa sortzen duten konposatu psikotropikoak daudela ondorioztatu daiteke.

6. ESKER ONAK

Lan hau aurrera eraman da Eusko Jaurlaritzaren ikerketa talde kontsolidatuentzako (IT-810-13) eta Espainiako Ekonomia eta Lehiakortasun Ministerioaren (ATREOVO proiektua, AGL-2015-63936-R) diru-laguntzarekin.

7. BIBLIOGRAFIA

- Antunes, S. C., Nunes, B., Rodrigues, S., Nunes, R., Fernandes, J., eta Correia, A. T. (2016). Effects of chronic exposure to benzalkonium chloride in *Oncorhynchus mykiss*: cholinergic neurotoxicity, oxidative stress, peroxidative damage and genotoxicity. *Environmental toxicology and pharmacology*, 45, 115-122.
- Aus der Beek, T., Weber, F. A., Bergmann, A., Hickmann, S., Ebert, I., Hein, A., eta Küster, A. (2016). Pharmaceuticals in the environment—Global occurrences and perspectives. *Environmental toxicology and chemistry*, 35(4), 823-835.
- Backhaus, T. (2014). Medicines, shaken and stirred: a critical review on the ecotoxicology of pharmaceutical mixtures. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 369(1656), 20130585.
- Brack, W., Dulio, V., Ågerstrand, M., Allan, I., Altenburger, R., Brinkmann, M. *et al.* (2017). Towards the review of the European Union Water Framework Directive: recommendations for more efficient assessment and management of chemical contamination in European surface water resources. *Science of the Total Environment*, 576, 720-737.

- Dvir, H., Silman, I., Harel, M., Rosenberry, T. L., eta Sussman, J. L. (2010). Acetylcholinesterase: from 3D structure to function. *Chemico-biological interactions*, 187(1-3), 10-22.
- Fan, L., Yakovlev, A. G., eta Faden, A. I. (1999). Site-specific cleavage of 28S rRNA as a marker of traumatic brain injury. *Journal of neurotrauma*, 16(5), 357-364.
- Fent, K., Weston, A. A., eta Caminada, D. (2006). Ecotoxicology of human pharmaceuticals. *Aquatic toxicology*, 76(2), 122-159.
- Ferk, F., Mišík, M., Hoelzl, C., Uhl, M., Fuerhacker, M., Grillitsch, B., *et al.* (2007). Benzalkonium chloride (BAC) and dimethyldioctadecyl-ammonium bromide (DDAB), two common quaternary ammonium compounds, cause genotoxic effects in mammalian and plant cells at environmentally relevant concentrations. *Mutagenesis*, 22(6), 363-370.
- Fulton, M. H., eta Key, P. B. (2001). Acetylcholinesterase inhibition in estuarine fish and invertebrates as an indicator of organophosphorus insecticide exposure and effects. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 20(1), 37-45.
- Gaber, M., Shawish, H. M. A., Khedr, A. M., eta Abed-Almonem, K. I. (2012). Determination of benzalkonium chloride preservative in pharmaceutical formulation of eye and ear drops using new potentiometric sensors. *Materials Science and Engineering: C*, 32(8), 2299-2305
- Gavrilescu, M., Demnerová, K., Aamand, J., Agathos, S., eta Fava, F. (2015). Emerging pollutants in the environment: present and future challenges in biomonitoring, ecological risks and bioremediation. *New biotechnology*, 32(1), 147-156.
- Geeraerts, C., eta Belpaire, C. (2010). The effects of contaminants in European eel: a review. *Ecotoxicology*, 19(2), 239-266
- Gorokhova, E., Löf, M., Halldórsson, H. P., Tjärnlund, U., Lindström, M., Elfving, T., eta Sundelin, B. (2010). Single and combined effects of hypoxia and contaminated sediments on the amphipod *Monoporeia affinis* in laboratory toxicity bioassays based on multiple biomarkers. *Aquatic toxicology*, 99(2), 263-274
- Grandjean, P., eta Landrigan, P. J. (2006). Developmental neurotoxicity of industrial chemicals. *The Lancet*, 368(9553), 2167-2178.
- Grimm, N. B., Faeth, S. H., Golubiewski, N. E., Redman, C. L., Wu, J., Bai, X., eta Briggs, J. M. (2008). Global change and the ecology of cities. *Science*, 319(5864), 756-760.

- Gros, M., Petrović, M., eta Barceló, D. (2007). Wastewater treatment plants as a pathway for aquatic contamination by pharmaceuticals in the Ebro river basin (northeast Spain). *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 26(8), 1553-1562.
- Hartley, M. R., eta Lord, J. M. (2004). Cytotoxic ribosome-inactivating lectins from plants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 1701(1-2), 1-14
- Kao, R., eta Davies, J. (1995). Fungal ribotoxins: a family of naturally engineered targeted toxins?. *Biochemistry and cell biology*, 73(11-12), 1151-1159.
- Kristofco, L. A., Du, B., Chambliss, C. K., Berninger, J. P., eta Brooks, B. W. (2015). Comparative pharmacology and toxicology of pharmaceuticals in the environment: diphenhydramine protection of diazinon toxicity in *Danio rerio* but not *Daphnia magna*. *The AAPS journal*, 17(1), 175-183.
- Li, M., eta Pestka, J. J. (2008). Comparative induction of 28S ribosomal RNA cleavage by ricin and the trichothecenes deoxynivalenol and T-2 toxin in the macrophage. *Toxicological Sciences*, 105(1), 67-78.
- Libus, J., eta Štorchová, H. (2006). Quantification of cDNA generated by reverse transcription of total RNA provides a simple alternative tool for quantitative RT-PCR normalization. *BioTechniques*, 41(2), 156-164.
- Matozzo, V., Tomei, A., eta Marin, M. G. (2005). Acetylcholinesterase as a biomarker of exposure to neurotoxic compounds in the clam *Tapes philippinarum* from the Lagoon of Venice. *Marine pollution bulletin*, 50(12), 1686-1693.
- Mittelholzer, C., Andersson, E., Consten, D., Hirai, T., Nagahama, Y., eta Norberg, B. (2007). 20b-hydroxysteroid dehydrogenase and cyp19a1 are differentially expressed during maturation in Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Journal of Molecular Endocrinology*, 39(4), 319-328.
- Nunes, B., Carvalho, F., eta Guilhermino, L. (2005). Characterization and use of the total head soluble cholinesterases from mosquitofish (*Gambusia holbrooki*) for screening of anticholinesterase activity. *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*, 20(4), 369-376.
- Olmo, N., Turnay, J., de Buitrago, G. G., de Silanes, I. L., Gavilanes, J. G., eta Lizarbe, M. A. (2001). Cytotoxic mechanism of the ribotoxin α -sarcin: induction of cell death via apoptosis. *European journal of biochemistry*, 268(7), 2113-2123
- Pelegrín, G. A. B., Serrato, F. B., eta Marinas, D. I. (2019). La gestión del agua depurada y la conservación del territorio y la biodiversidad. El caso de las lagunas de Campotejar y

- las Moreras en la Región de Murcia (SE España). *Estudios Geográficos*, 79(285), 397-417.
- Peña-Llopis, S., Ferrando, D., eta Peña, J. B. (2003). Increased recovery of brain acetylcholinesterase activity in dichlorvos-intoxicated European eels *Anguilla anguilla* by bath treatment with N-acetylcysteine. *Diseases of aquatic organisms*, 55(3), 237-245
- Quinn, D. M. (1987). Acetylcholinesterase: enzyme structure, reaction dynamics, and virtual transition states. *Chemical Reviews*, 87(5), 955-979.
- Rahman, M. S., Khan, I. A., eta Thomas, P. (2011). Tryptophan hydroxylase: a target for neuroendocrine disruption. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B*, 14(5-7), 473-494.
- Rice, D. C. (2008). Overview of modifiers of methylmercury neurotoxicity: chemicals, nutrients, and the social environment. *Neurotoxicology*, 29(5), 761-766.
- Rojo-Bartolomé, I., de Cerio, O. D., Diez, G., eta Cancio, I. (2016). Identification of sex and female's reproductive stage in commercial fish species through the quantification of Ribosomal Transcripts in gonads. *PloS one*, 11(2), e0149711.
- Ros, O., Vallejo, A., Olivares, M., Prieto, A., eta Etxebarria, N. (2018). Konposatu disruptore endokrinoen azterketa kimika analitikoaren ikuspuntutik. *Ekaia. EHUko Zientzia eta Teknologia aldizkaria*.
- Smolders, R., Bervoets, L., Wepener, V., eta Blust, R. (2003). A conceptual framework for using mussels as biomonitors in whole effluent toxicity. *Human and Ecological Risk Assessment*, 9(3), 741-760.
- Solagaistua, L. (2019). Testing the effects of food quality, as well as chemical contamination of water and sediments, on aquatic detrital systems using laboratory experiments. (Tesi doktoralak). Euskal Herriko Unibertsitatea, Leioa.
- Souza, M. S., Balseiro, E., Laspoumaderes, C., eta Modenutti, B. (2010). Effect of ultraviolet radiation on acetylcholinesterase activity in freshwater copepods. *Photochemistry and Photobiology*, 86(2), 367-373.
- Trapp, J., Armengaud, J., Pible, O., Gaillard, J. C., Abbaci, K., Habtoul, Y., et al. (2014). Proteomic investigation of male *Gammarus fossarum*, a freshwater crustacean, in response to endocrine disruptors. *Journal of proteome research*, 14(1), 292-303.
- Trudeau, V. L., Metcalfe, C. D., Mimeault, C., eta Moon, T. W. (2005). Pharmaceuticals in the environment: Drugged fish?. In *Biochemistry and Molecular Biology of Fishes* (Vol. 6, pp. 475-493). Elsevier.
- UNESCO. (2017). The United Nations World Water Development Report. Italia.

- Van Boeckel, T. P., Gandra, S., Ashok, A., Caudron, Q., Grenfell, B. T., Levin, S. A., et al. (2014). Global antibiotic consumption 2000 to 2010: an analysis of national pharmaceutical sales data. *The Lancet Infectious Diseases*, 14(8), 742-750
- Vargas, R., et al. Ponce-Canchihuamán, J. (2017). Emerging various environmental threats to brain and overview of surveillance system with zebrafish model. *Toxicology reports*, 4, 467-473
- Vieira, C. E. D., Costa, P. G., Cabrera, L. C., Primel, E. G., Fillmann, G., Bianchini, A., et al. dos Reis Martinez, C. B. (2017). A comparative approach using biomarkers in feral and caged Neotropical fish: implications for biomonitoring freshwater ecosystems in agricultural areas. *Science of the Total Environment*, 586, 598-609.
- Vollestad, L. A. (1992). Geographic variation in age and length at metamorphosis of maturing European eel: environmental effects and phenotypic plasticity. *Journal of Animal Ecology*, 41-48.
- Wepener, V. (2013). Active biomonitoring. *Encyclopedia of Aquatic Ecotoxicology*, 15-20.
- Wickramasinghe, W. A. D., Mubiana, V. K., et al. Blust, R. (2017). The effects of heavy metal concentration on bio-accumulation, productivity and pigment content of two species of marine macro algae. *Sri Lanka Journal of Aquatic Sciences*, 22(1).
- Wigh, A., Geffard, O., Abbaci, K., Francois, A., Noury, P., Bergé, A et al. (2017). *Gammarus fossarum* as a sensitive tool to reveal residual toxicity of treated wastewater effluents. *Science of the Total Environment*, 584, 1012-1021.
- Williams, E. S., Berninger, J. P., et al. Brooks, B. W. (2011). Application of chemical toxicity distributions to ecotoxicology data requirements under REACH. *Environmental toxicology and chemistry*, 30(8), 1943-1954
- Winnebeck, E. C., Millar, C. D., et al. Warman, G. R. (2010). Why does insect RNA look degraded?. *Journal of Insect Science*, 10(1), 159.
- World Health Organization. (2006). Guidelines for the safe use of wastewater, excreta and greywater.