



Universidad
del País Vasco

Euskal Herriko
Unibertsitatea

ZIENTZIA
ETA TEKNOLOGIA
FAKULTATEA
FACULTAD
DE CIENCIA
Y TECNOLOGÍA



Gradu Amaierako Lana / Trabajo Fin de Grado

Biologia Gradua / Grado en Biología

Euskal kostaldeko bi muskuilu espezieetan (*Mytilus galloprovincialis* eta *Xenostrobus securis*) petrolioak eta sakabanatzaileak eragindako efektu biologikoen konparaketa

Egilea /Autor/a:

Uxue Telleria González

Zuzendariak /Directores/as:

Urtzi Izagirre Aramaiona

Xabier Lekube Iturrioz

© 2019, Uxue Telleria González

Leioa, 2019ko uztailaren 22a / Leioa, 22 de julio de 2019

AURKIBIDEA

LABURPENA.....	2
ABSTRACT.....	2
1. SARRERA	3
Hipotesiak	7
Helburuak.....	7
2. MATERIALAK ETA METODOAK.....	7
2.1. Muskuiluak biltzea	7
2.2. Muskuiluen aklimatazioa	8
2.3. Esperimentua.....	8
2.4. Ehun mailako biomarkatzaileen ikerketa	9
2.5. Sexu-ratioa, gametoen garapen faseak eta gonaden indizea	11
2.6. Datuen analisisa	13
3. EMAITZAK.....	13
3.1. Ehun mailako biomarkatzaileen ikerketa	13
3.2. Sexu-ratioa, gametoen hazkuntza faseak eta gonaden indizea	16
4. EZTABAIDA.....	18
5. ONDORIOAK.....	20
6. ESKER ONAK.....	21
7. BIBLIOGRAFIA.....	21
8. ERANSKINAK.....	25

LABURPENA

Azken urteotan, Europar kontinentea bustitzen duten uretan zehar itsas-trafikoak eta itsas zabaleko zulaketak handitu dira, uren kutsadura mailak gora egitea eraginez. Kutsatzaileak itsasoko uretara heltzen direnean, organismoen barnera sar daitezke eta elikadura katean aurrera egin dezakete. Kutsadurak izaki bizidunetan duen eragina nolakoa den jakiteko, itsasoko uraren analisi kimikoak egitea ez da nahikoa. Horregatik, itsas fauna ikertzen da. Askotan, bibalboak (muskuluak, ostrak...) erabiltzen dira banaketa geografiko zabala daukatelako, animalia sesilak direlako, lagintzeko errazak direlako eta kutsatzaileen aurrean erantzun biologiko neurgarriak izaten dituztelako. Hori dela eta, kostaldeko eta estuarioetako osasuna aztertzeko esperimentu bat gauzatu zen Plentziako itsas Estazioan (PiE, EHU/UPV). Bilboko itsasadarreko estuarioan bildutako bi muskuilu espezieren (*Mytilus galloprovincialis* eta *Xenostrobus securis*) petrolioaren uretan egokitutako frakzioaren (UEF) kontzentrazio altuaren (UEF % 25) eta petrolioaren eta sakabanatzailearen uretan egokitutako frakzioaren kontzentrazio baxuaren (UEF % 5+S) aurreko eragina aztertu zen. Horretarako muskuiluak bildu, 15°C-ko eta 20 PSU-ko ur gazira aklimatatu eta baldintza esperimental desberdinetan kokatu ziren. Indibiduoak 0. eta 7. egunetan disezcionatu ziren kutsatzaileek eragindako aldaketak aztertzeko. Horretarako muskuiluen gonaden garapena eta ehun mailako zenbait biomarkatzaile erabili ziren: digestio guruineko zelula moten kopurua (zelula basofiloen bolumenaren dentsitatea, $V_{V_{BAS}}$), epitelioaren lodieraren eta lumeneko zein dibertikuluetako erradioaren arteko erlazioa (MLR/MET eta MET/MDR) eta dibertikuluen eta ehun konektiboaren arteko erlazioa (CTD ratioa). Gainera, espezieak beraien kabuz aztertzeaz gain, elkarrekiko konparaketa ere burutu zen.

Gako- hitzak: *Mytilus galloprovincialis*, *Xenostrobus securis*, biomarkatzaileak, $V_{V_{BAS}}$, MLR/MET, MET/MDR, CTD ratioa, gonaden indizea.

ABSTRACT

In the last few years, marine traffic and offshore drilling in the European Seas have increased, which has caused the increase of the water pollution. When contaminants are introduced in seawater, they can enter inside organisms and can go into the food chain. To know how the effects made by contaminants are, depending on only chemical analyses of seawater is not enough. That's why marine organisms are analysed. Frequently, marine bivalves (such as mussels and oysters) are used because of their geographical distribution and sessile lifestyle, and also because they are easy to sample. Furthermore, they have measurable biological responds in the face of contaminants. Therefore, in order to study estuaries and the health of coastal waters an experiment was carried out in the Marine Station of Plentzia (PiE-UPV/EHU). Two species of mussels (*Mytilus galloprovincialis* and *Xenostrobus securis*) were collected from Bilbao's estuary to analyse the effects of the Water Accommodated Fraction of crude oil (WAF) at a high concentration (WAF25%) and WAF of crude oil with dispersant (WAF5%D) at 15 °C and 20 PSU (Practical Salinity Unit). With this aim, mussels were collected, acclimatised to 15 °C and

20 PSU seawater and located in different experimental conditions. Individuals were dissected the 0 and the 7th day to examine the changes caused by the contaminants. So, gonadal development and some tissue-level biomarkers were studied: the quantity of the digestive gland cell types (volume density of basophilic cells, VVBAS), the epithelium thickness and the luminal and diverticular radius relation (MLR/MET eta MET/MDR) and connective to diverticula ratio (CTD). In addition, besides analysing species on their own, an interspecies comparison also was made.

Keywords: *Mytilus galloprovincialis*, *Xenostrobus securis*, biomarkers, V_{VBAS}, MLR/MET, MET/MDR, CTD ratio, gonad index.

1. SARRERA

Ozeano eta itsasoek Lur planetaren gehiengoa estaltzen dute eta lehorreko ekosistemetan baino dibertsitate altuagoa daukate. Ingurumen ozeanikoa ekosistema oso konplexua da; izan ere, faktore biotiko eta abiotikoez eragina izan dezakete. Are gehiago, ziklo biogeologikoez zein gizakia-jarduerak eragina izan dezakete animalia zein landare itsastarretan eta kalte horiek elika katean aurrea egin ahala, gizakiengana ere hel daitezke (Depledge *et al.*, 2013).

Azken urteotan, Europar kontinentea bustitzen duten uretan zehar itsas-trafikoa eta itsas zabaleko zulaketak handitu dira. Hori dela eta, gure kontinentea inguratzen duten uren kutsadura mailak gora egin du. Alabaina, petrolio da kutsatzaile behinena eta oharkabean gertatzen diren isuriak dira petrolioaren sarrera nagusienak. Dena den, kontuan hartzekoak dira itsasontzien hondoratzeak gertatzen direnean itsasoko uretara heltzen diren olio gordin eta erregaiaren egundoko kantitateak. Petrolio gordina ekoizkin guztiz naturala da, lurrazpiko hidrokarburo-nahastea da funtsean. Hala ere, ohiko hidrokarburoaz (karbono eta hidrogenoz osatutako konposatu organikoa) gain, bestelako material organikoz ere osatua dago, hidrokarburo aromatiko polizikliko (HAP) (polycyclic aromatic hydrocarbon, PAH, ingelesez) bat barne (Widdows, 1982). HAP izugarri kaltegarria da itsasoko izaki bizidunentzat, nahiz eta espezie bakoitzak tolerantzia tarte desberdina daukan. Petrolio gordin ohikoenak HAP % 0,2 - % 7 tarteko kantitatea dauka (Ma *et al.*, 2017). Hortaz, petrolio gordina findu gabeko petroliozko olio bat da, gasolioa, gasolina eta bestelako petrokimikoak sortzeko findu daitekeena (Widdows, 1982), eta gaur egun munduan zehar gehien erabiltzen den energia iturria da.

Uretan Egokitutako den Frakzioa (UEF) pisu molekular baxuko hidrokarburoen disoluzioa da, petroliozko hidrokarburoen nahasteak urarekin kontaktua egitean lortzen dena. Haizeagatik, olatuengatik eta korranteengatik sortutako olio konposatuen eta uraren nahasteak uretan egokitutako frakzioa (UEF, ingelesez Water-Accommodated Fraction (WAF)) askatzea ekar dezake. WAF, beraz, nahasketa indarren ondorioz sortutako bereizketa aldiaren ostean fase akuosoan irauten duen petrolioaren atala da. Nahiz eta normalean hidrofobotzat jotzen diren, petroliozko hidrokarburo asko uretan disolbagarriak dira. Nahaste horrek disolbatzaile gutxi izaten ditu pisu molekular handiko konposatuak dituen eta, aldiz,

disolbatzaile asko konposatu kimiko eta biologiko degradagarriak dituenan (Neff *et al.*, 2000; Harrison & Lamont, 2002).

Olio isurketa bat gertatzen denean, kostaldeko ekosistemetan eragina nabarituko da. Izan ere, etengabeko olio isurpenen eraginpean daude, olatuek eta mareek olioaren itsas bazterrean eramaten baitute (Pampanin & Sydnes, 2013). Gaur egun, isurpen horiek gertatzen direnean, eragina ahalik eta txikiena izan dadin, petrolioaren garbitzeko erantzun metodoak daude: olioaren biodegradagarria den kasuetan, ezer ez egitea eta olioaren zikloa burutzen uztea eta, beste kasuetan, erauzketa mekanikoa, *in situ* erreketak, garbitzaile kimikoak edo sakabanatzaileak erabiltzea. Hala ere, kontuan hartu behar dira zenbait faktore fisiko garbiketarako burutzeko; olio isuriaren tamainak, haizearen abiadura, uraren tenperaturak, baliabideen arriskuak, habitaten arriskuak eta abarrek zuzenean zein pasiboki eragin baitezakete. Beraz, parametro anitz hartu behar dira kontuan metodo egokiena hautatzerakoan, bai eta ingurumenaren osasunaren analisia ere (Walther, 2014).

Sakabanatzaileei (S, ingelesez dispersant (D)) dagokienez, biodegradazioa hobetzeko erabiltzen dira, olioaren emulsionatzen baitute (Word, 2014). Dena dela, oraindik ere ura kutsatzen jarraitzen du olioaren kutsatzaileek ez baitute olioaren ezabatzen. Gainera, sakabanatzaileek ere efektu toxikoak izan ditzakete. Hortaz, olioaren eta sakabanatzailearen osatutako nahasteak organismo urtarrei kalteak (zelula mailakoak zein molekularrak) eragin diezazkieke. Horien adibide dira molusku bibalbioak; izan ere, ezin dute kutsatzaileetatik ihesik egin, substratuari finkatuta bizi baitira. Ondorioz, itsasoko petrolio gordinaren eta olioaren eta sakabanatzailearen nahasteen zein bestelako kutsatzaileen kontrol jarraia egitea beharrezkoa da gaur egun (Major *et al.*, 2016; Blanco-Rayón, 2018; Faggio *et al.*, 2018).

Kutsatzaileak itsasoko uretara heltzen direnean, eskuragarri daude edozein bizidunek xurgatzeko. Horrela, organismo txikien barnera sar daitezke edota animalia handiagoetan eta elikadura katean aurrera egingo dute, harrapari handienetara ere helduz. Gainera, gizakiok itsasak jaten ditugunez, gu ere kutsa gaitezke. Hori dela eta, garrantzitsua da kutsatzaileek sortzen duten kaltea ikertzea, ur-zutabeko organismoentzat eta itsas ornogabeentzat toxikoak direlako (beraien bizimodurako, bai eta ugalketarako ere). Edonola ere, itsasoko uraren analisi kimikoak egitea ez da nahikoa, horien emaitzek ez baitute erakusten kutsadurak izaki bizidunetan duen eragina nolakoa den. Horregatik, itsas fauna ikertzea da egokiena (Lekube, 2014). Hori horrela, bibalbioak (muskuluak, ostrak...) erabiltzen dira banaketa geografiko zabala daukatelako, animalia sesilak direlako, lagintzeko errazak direlako eta kutsatzaileen aurrean erantzun biologiko neurgarriak izaten dituztelako. Moluskuetan kutsatzaileek dituzten efektuak ikusteko, biomarkatzaileak erabiltzen dira (Lewis *et al.*, 2008; Coughlan, 2018).

Muskuluak metabolismo baxuko animalia iragazleak dira eta, beraz, beraien ehunetan agertzen den kutsatzaile kantitatea inguruko uretan dagoenaren kontzentrazioaren erakusle da (Zorita *et al.*, 2007; Coughlan, 2018). Itsas bazterreko ekosistemetako animalia garrantzitsuak direnez, kutsadura jarraipenaren ikerketarako abisu sistema goiztiarra dira (Faggio *et al.*, 2018). Muskuluak genetikaren bitartez oso ikertuak izan dira azken hamarkadetan, espezieak beraien artean ezberdintzea zaila delako eta zenbait espezie batera bizi ohi direlako, bai eta hibridoak sortzen dituztelako ere. Gainera, erantzun fisiologiko desberdinak (tenperatura zein osmolaritateari dagozkionak) eta kutsatzaileen aurre egiteko mekanismo eta tolerantzia maila desberdinak ere badituzte (Katolikova *et al.*, 2016; Mathiesen *et al.*,

2017). HAP-ei dagokienez, muskuiluen gantz ehunetan metatzen dira eta, horregatik, kutsaduraren bioindikatzailerik aproposak dira (Capello, *et al.* 2013). Arrazoi horien guztiengatik, International Corporation for the Exploration of the Seas (ICES) elakartearen arabera, muskuiluak biomonitorizaziorako gomendatutako animaliak dira (ICES, 2011).

Muskuiluen artean, *Mytilus* generokoak aipatzekoak dira habitat oso desberdinetan agertzen direlako: marearteko eta marea-azpiko guneeetan, estuarioetan... Halere, gehienbat ipar eta hego hemisferiko ur hotz eta epeletako itsasertz arroksuetan ageri dira (Mathiesen *et al.*, 2017; Blanco-Rayón, 2018). Hainbeste habitatetan agertzen dira, non kutsaduraren eragina aztertzeko izaki bizidun egokiak diren. Europan zehar hiru espezie bizi dira: *M. trossulus*, *M. edulis* eta *M. galloprovincialis*. GRACE proiektuaren barnean, espezie horiek guztiak konparatu dira, baita *Xenostrobus securis* ere. Lan honetan, *Mytilus galloprovincialis* eta inbaditzailea den *Xenostrobus securis* aztertu dira (1. Irudia). Izan ere, biak topa ditzakegu euskal estuario batzuetan zehar, nahiz eta espezie inbaditzailearen banaketa zehatza guztiz argi ez dagoen.



1. Irudia. Lan honetan aztertutako bi muskuiluen argazkia. Ezkerrekoa *Mytilus galloprovincialis* eta eskuinekoa *Xenostrobus securis* (Kredituak: Endika Gil Uriarte).

Mytilus galloprovincialis 1819an Lamarck-ek deskribatutako eta sailkatutako muskuilua da. Mediterraneo itsasoko muskuilua da jatorriz, nahiz eta gaur egun euskal kostaldean aurki dezakegun. Europan zehar, Mediterraneo Itsasoan agertzeaz gain, Itsaso Beltzean, Ozeano Atlantikoaren kostaldean, Frantziako kostaldean, Britainia handiko eta Irlandako irlen kostaldean, Ipar Itsasoan eta Norvegiako itsasoan daude. Gainera, Ozeano Pazifikoan ere aurki ditzakegu, Kaliforniako eta Washingtoneko kostaldean, Japonian, Ipar Korean eta Txinan. Hego hemisferioan ere bizi da, Hego Afrikan, Namibian, Australian, Tasmanian eta Zeelanda Berrian zehazki (Wonham, 2004; Branch *et al.*, 2005; Hilbish *et al.*, 2010; Mathiesen *et al.*, 2017). Marearteko zein marea-azpiko guneeetan bizi ohi da, salbuespenak salbuespen, eta populazio dentsitate altuko muskuilu ohantzeak sortzen dituzte. Zenbaitetan, estuarioetako behe atalean agertzen dira, ur gezak itsasoarekin bat egiten duen gunean. Horrelakoetan, *X. securis*-ekin batera bizitzeko gai dira. *M. galloprovincialis* espezieko muskuiluak gai dira *M. edulis* eta *M. trossulus* muskuiluekin hibridatzeko (Mathiesen *et al.*, 2017).

Xenostrobus securis muskuilua Lamarck-ek deskribatu eta sailkatu zuen 1819an, baina gerora generoz aldatu zuten. Bere izen arrunta muskuilu beltz pigmeoa da (García *et al.*, 2007). Jatorriz Asiako hego-ekialdeko, Australiako eta Zeelanda Berriko muskuilua den arren, euskal kostalderaino heldu den muskuilu espezie inbaditzaile bat da (Kimura & Sekiguchi, 2009). Italiako kostaldeko zenbait lakuetara (1992an aurkitu zen), Frantziako Mediterraneora, Japoniara baita Galiziako kostaldera (2007an aurkitu

zen) heldu da *X. securis* muskuilua (Garci *et al.*, 2007). Espezie hori, 1-31 PSU-ko ur gazietan bizi ohi da. Tolerantzia tarte nahiko zabala daukanez, estuarioetan barrena bizi daiteke, betiere inpaktu negatiboa sortuz ekosistemetan (Pascual *et al.*, 2010). 20-30 mm-ko batez besteko luzera dute; hala ere, batzuk 47 mm izatera hel daitezke. *X. securis* muskuiluak substratu gogorretara atxikita bizi ohi dira (harriak, egurra, ostren kuskua...) (Wilson, 1969; Garci *et al.*, 2007; Kimura & Sekiguchi, 2009).

Itsas uretako edozein parametroren aldaketak, kutsatzaileen kantitateak gora egiteak, besteak beste, eragina izan dezake muskuiluetan. Izan ere, aldaketa txikiak ere eragina du beraiengan eta estres baldintza horri aurre egiteko asmoz, hainbat mekanismo jartzen dituzte martxan. Mekanismo horiek estresaren arabera desberdinak izango dira eta ehun mailakoak, zelula mailakoak zein molekularrak izan daitezke. Muskuiluetan kutsatzaileen edota estresaren eraginez sortzen diren aldaketa horiei biomarkatzaile deritze. Horiek neurtu daitezke eta muskuiluen osasuna zein beraien ingurua nola aldatu diren jakiteko erabil daitezke. Azken hamarkadetan, biomarkatzaileen erabilera oso ohikoa da ingurumeneko kutsaduraren jarraipenetan. Bestalde, esan beharra dago biomarkatzaileak bi taldetan sailkatzen direla: inguruneko faktore estresagarriekiko esposizioa islatzen dutenak eta kutsatzaileek osasunean eragindako kalteak islatzen dituztenak (Hook *et al.*, 2014; Luna-Acosta *et al.*, 2017).

Petrolio kutsaturiko ingurune batean bizi diren muskuiluek, ura filtratzean, elikagaiez gain kutsatzaileak ere barneratuko dituzte. Kutsatzaileek elikagaien bide bera jarraituko dute, hau da, brankien artean ibiliko dira eta urdailera ere iritsiko dira. Urdailera heltzean, digestio-guruinean zehar hedatuko dira. Izan ere, digestio-guruina urdailean amaiera duten guruin adarkatu albeolarrez osatuta dago eta, beraz, tutuen irteeratik barnera joko dute kutsatzaileek, muskuiluen ehunetan metatuz (Owen, 1955). Albeolo horien epitelioaren lodieraren aldaketak eta alboetako zelula moten (digestio zelulak eta zelula basofiloak) kantitatearen aldaketak erabili ohi dira ekotoxikologiako ikerketetan biomarkatzaile gisa (Marigómez *et al.*, 2013). Esan bezala, tutuen amaieran dauden albeoloen epitelioan bi motatako zelulak desberdin daitezke: digestio-zelulak eta zelula basofiloak. Digestio-zelulek sistema endolisosomiko garatua dute. Hortaz, urdailetik iristen diren elikagaien endozitosisa burutzen dute eta, jarraian, horien digestio intrazelularra. Gauzak horrela, kutsatzaile gehienak elikagaiekin batera xurgatzen dira (Lekube, 2014). Zelula basofiloak bestalde, liseriketa estrazelularraz arduratzen dira zelula jariatzaileak direlako. Ohiko egoeran, hau da, kutsatzaile gabeko muskuiluetan, digestio-zelulen kantitatea zelula basofiloena baino askoz handiagoa da. Estrespeko egoeretan, ordea, hidrokarburoen esposizioan badaude esaterako, zelula basofiloen kantitate erlatiboak nabarmenki gora egiten du, liseri zelulen kopurua edo azalera aldatzen delako (Zaldibar *et al.*, 2007).

Lan hau “Integrated oil spill response actions and environmental effects” (GRACE proiektua)-ren esparruan burutu da. Duela gutxi hasitako proiektua da eta Europar Batasunak finantziazten du Horizonte 2020 programaren bidez. Proiektu horren helburu nagusia da klima hotzeko eta izotzez beteriko Ozeano Atlantikoko Iparraldean eta Itsaso Baltikoan hidrokarburoen isurpenak ingurumenean duen eragina eta isurpen horien aurreko erantzunen eragina zein den aztertzea, hau da, biomarkatzaileak erabiliz olioaren eta sakabanatzailearen eragina ikertzea. GRACE proiektuan hiru *Mytilus* espezie (*M. trossulus*, *M. edulis* eta *M. galloprovincialis*) erabiltzea adostu zen. Hori dela eta, lan honetan *M. galloprovincialis*-en biomarkatzaileak neurtu dira petrolio gordinaren (WAF) eta petrolio gordinaren eta

sakabanatzailearen arteko nahastearen (D+WAF) esposizioetan zehar, baita Euskal Herriko estuarioetan inbaditzailea den *Xenostrobus securis*-enak ere. Izan ere, interesgarria izan daiteke espezie inbaditzaileak kutsatzaileen aurrean duen erantzuna ulertzeko eta *M. galloprovincialis*-ekin konparatzeko. Gainera, biak batera bizi daitezkeenez, kutsatzaileen aurreko erantzunen interpretazio okerrak egin ahal dira eta, hortaz, ondorio egokiak lortu ahal izateko, beharrezkoa da *X. securis*-en biomarkatzaileen balioak nolakoak diren jakitea.

Hipotesiak

Bai histopatologiako aldaketak bai ehun mailako biomarkatzaileak adierazle egokiak dira bi muskuilu espezieetan, *M. galloprovincialis*-en eta *X. securis*-en, petrolio gordinaren (WAF) eta petrolio gordinaren eta sakabanatzailearen arteko nahastearen (D+WAF) aurreko esposizioak sortutako aldaketak neurtzeko. Bestalde, bi espezieen kutsatzaileen aurreko erantzunak, biomarkatzaileen balioen aldaketak, desberdinak dira.

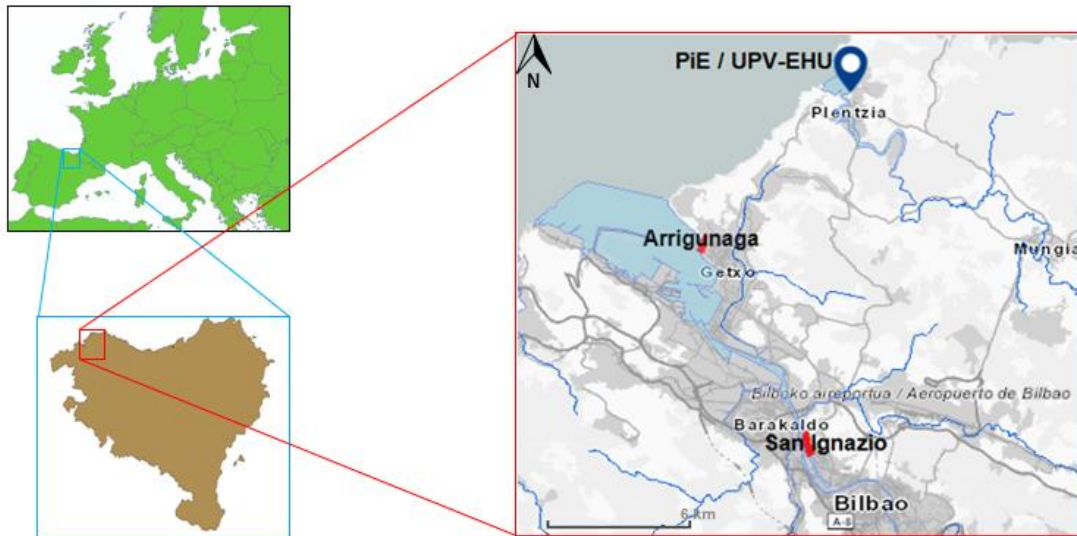
Helburuak

Lan honen helburu orokorra da aurretik finkatutako denbora tarte zehatz batean muskuilu espezie bakoitzak petrolio gordinaren (WAF) eta petrolio gordinaren eta sakabanatzailearen arteko nahastearen (D+WAF) aurreko erantzun biologikoak aztertzea. Hau da, muskuiluen olio kutsaduraren aurreko erantzun histologikoa, ehun mailako biomarkatzaileen balioen aldaketa, ikertzea. Beste jomuga bat da kutsatzaileen aurreko esposizioak bi espezieetako gonadetan izan dezakeen eragina behatzea. Azkenik, helburu horiez gain, bi espezieen erantzunak konparatzea ere izan da xedea.

2. MATERIALAK ETA METODOAK

2.1. Muskuiluak biltzea

Ikerketa honetan, bi muskuilu espezie aztertu ziren: bata *Mytilus* generokoa, *M. galloprovincialis*, eta bestea *Xenostrobus* generokoa, *X. securis*. Lan hau aurrera eramateko, muskuiluak Bilboko estuarioko bi gune desberdinetan bildu ziren: *M. galloprovincialis* espeziekoak Arrigunagan lortu ziren (43°21'N 3°01'W; Getxo, Bizkaia) eta *X. securis*-ekoak San Ignazio (43°17'N 2°58'W; Bilbo, Bizkaia) (2. Irudia).



2. Irudia. Muskui luak bildu ziren gunek eta erabilitako laborategia erakusten dituzten mapak. Laginketa-puntuak: Arrigunagako hondartza (Bizkaiko kostaldean) eta San Ignazio (Bilboko itsasadarrean). Laborategia: Plentziako Itsas Estazioa (PiE/UPV-EHU) (www.geo.euskadi.eus).

Esan bezala, muskuiluak bi gune desberdinetan bildu ziren, Arrigunagan eta San Ignazion. Bi kokapenetan batutako muskuiluak PiE-UPV/EHU-ra, Plentziako Itsas Estaziora (43°24'N 2°56'W; Bizkaia, Euskal Herria), ekarri ziren. *M. galloprovincialis* espezieko muskuiluak 2017ko azaroaren 3an heldu ziren Plentziara. Bildu zirenean, beraien luzeraren batezbestekoa 3,5 eta 5 zm-koa zen. Gainera, uraren tenperatura 16°C-koa eta gazitasuna 31 PSU-koa ziren. *X. securis* espeziekoak, aldiz, bi egun beranduago heldu ziren estaziora, 2017ko azaroaren 5ean zehazki. Bildutako aleen luzera 2,5 eta 4 zm tartekoa izan zen. Mareartekoa den espezie inbaditzaile hori Bilboko estuarioko goialdeko ur gazietan batu zen, non uraren gazitasuna mareen eta euriteen arabera aldatzen den. Muskui luak jaso zirenean, uraren tenperatura 15°C-koa zen eta gazitasuna, berriz, 22 PSU-koa.

2.2. Muskui luen aklimatazioa

Behin muskuiluak Plentziako Itsas Estaziora helduta, espezieak banatuta mantendu ziren, bakoitza etengabe mugimenduan zegoen itsas-urezko akuario batean. Izan ere, esperimentua hasi aurretik 15°C-ko eta 20 PSU-ko ur gazira aklimatatu ziren muskuiluak (GRACE-n adostasunaren arabera), estaziora heldutako egunetik 2017ko azaroaren 10rera bitartean.

2.3. Esperimentua

M. galloprovincialis eta *X. securis* muskuiluak % 25eko WAF (WAF25) eta % 5eko WAF olio gehi sakabanatzailearen (D+WAF5) eraginpean jarri ziren zazpi egunez. Kontzentrazio horiek aurreko esperimentu bateko datuetan oinarrituta erabaki ziren. Muskui luak akuarioetan jarri ziren 15°C-ko tenperatura eta 20 PSU-ko gazitasunean. WAF25 nahastea sortzeko Equinor (Norvegiako petrolio konpainia) enpresako ipar Atlantikoko olio nafteniko gordina urarekin nahastu zen (1:200 olio/ur proportzioan). D+WAF5 nahastea egiteko olio berdina erabili zen, baina kasu honetan, urarekin nahastu

aurretik Finasol OSR52 sakabanatzailearekin nahasi zen (1:10 sakabanatzaile/ur proportzioan). Bi tratamenduetarako sortutako WAF energia baxua erabiliz ekoiztu zen. Hain zuzen ere, osagaiak egokiro nahasteko irabiagailu txiki bat erabili zen, 40 orduz eta 10°C-ko temperatura eta 20 PSU-ko uretan (GRACE-n adostasunaren arabera). Jarraian, nahasketa zortzi egunez mantendu zen atsedenean giro temperaturan eta, horrela, olio tanta handiagoak heldu ziren azaleraino. Atsedean horri esker, azpian geratutako WAF ken zitekeen Mariotte botiletatik.

Saiakuntzarekin hasteko, bi hozkailu industrialetan 30 litroko edukiera duen kristalezko 12 arrainontzi kokatu ziren (3. Irudia). Talde esperimental bakoitzeko bi arrainontzi prestatu ziren. Amoniako, gazitasun, oxigeno eta temperatura neurketak egin ziren bai WAF zuten arrainontzietan bai kontroloetan. Gainera, bi egunero ur zikina garbiagatik aldatu zitzaien muskuiluei eta WAF berriro ere gehitu. Arrainontziak urez berbetetzean, mikroalgaz (Microalgae Composed Diet®, Acuinuga, *Isochrysis* spp., *Tetraselmis* spp., *Pavlova* spp., *Nannochloropsis* spp. and *Spirulina* spp.) egindako elikagaia eman zitzaien muskuiluei.



3. Irudia. Hozkailuan jarritako akuarioen eta horien mantentze sistemaren argazkia.

Aurretik hautatutako denbora tarte bakoitzean, 20 muskuilu erauzi ziren tratamendu bakoitzetik (kontrola, WAF25 eta D+WAF5), hau da, 10 arrainontzi bakoitzetik. Beraz, 20 muskuilu hartu ziren kontrol taldetik (t0 eta t7K), beste 20 WAF25 taldetik (t7W) baita beste 20 D+WAF5 taldetik (t7DW) ere. Laginketak esperimentuaren hasieran (t0), hiru egun beranduago (t3) (lan honetan aztertu ez dena) eta astebeteren ondoren (t7) egin ziren. Banakako guztiak elikatuak izan aurretik lagindu ziren.

2.4. Ehun mailako biomarkatzaileen ikerketa

Muskuiluak hiru egun desberdinetan (t0, t3 eta t7) disezcionatu ziren. Horretarako, bi kustuak zabaldu ondoren, muskuiluen gorputz bigunaren zehar-ebaki bat (digestio guruina, mantua, zakatzak eta oina dituen) hartu zen eta banakako kaseteetan sartu ziren. Aukeratutako zatiaren analisi histologikoa egiteko, lehendabizi % 4ko formaldehido kontzentrazioa duen itsas uretan finkatu zen 24 orduz.

Finkatutako laginak deshidratatzeko, ehunen prozesamendu automatikoa burutzen duen makina erabili zen: laginak etanol kontzentrazio desberdineko serieetatik (% 70, % 96 eta absolutua) (1. Eranskina), % 99-ko alkoholetik eta xilenotik pasatu ziren eta, jarraian, parafina likidoan txertatu ziren (Leica ASP 300S, Germany). Behin parafina blokeak solidotuta, denbora tarte laburrez izotz plakan hoztu eta mikrotomoz ebaki ziren 5µm lodieradun sekzioetan (Leica, RM 2255& RM2125 RTS, Germany).

Ebakiak ur berotik pasatu ostean, errotulaturako portetan jarri ziren (2-3 ebaki porta bakoitzeko). Horiek azpiletan kokatu eta 37°C-tan mantentzen den labean sartu ziren, lehortzeko. Behin ebaki guztiak prest zeudenean, hematoxilina-eosinaz tindatu (2. Eranskina) ziren tindatzaile automatikoan (Leica autostainer XL, CV 5030, Germany). Tindaketa prozesua amaitzean, kanpaira pasatu ziren xilenoa guztiz ezabatzeko eta laborategia ez kutsatzeko asmoz.

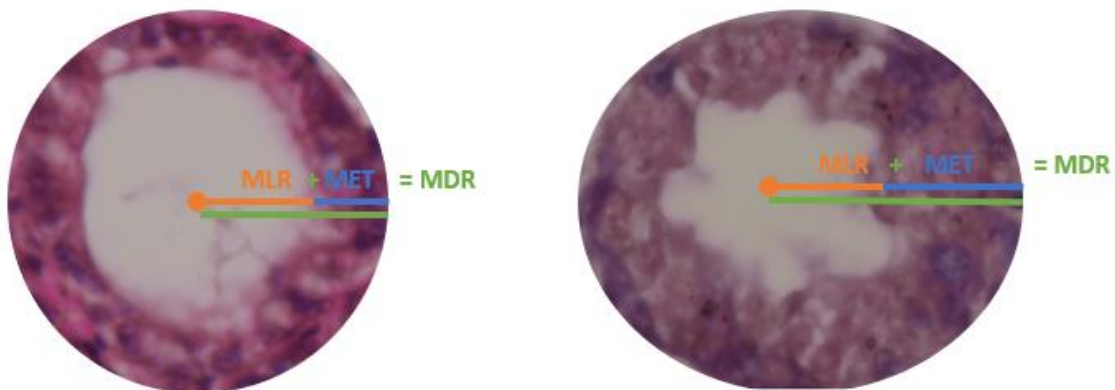
Portak x40-ko handipenarekin begiratu ziren marrazteko hodi bat erantsia zuen argi-mikroskopia batean (Nikon eclipse Ni-U). Horrela, irudi histologikoa eta Weibel-en gratikula gainjarri daitezke (Weibel, 1979). Orri hori helburu anitzeko sistema (M-168) gisa erabiltzen da eta betetzeari esker, zelula basofiloen, digestio-zelulen, albeoloen lumenen eta ehun konektiboaren agerraldiak jaso ziren (Weibel, 1979; Garmendia *et al.*, 2011). Digestio-hodiko eta guruineko leku desberdinetan neurtutako eremuak zoriz aukeratu ziren, porta bakoitzeko hiru eremu aztertu zirelarik.

Albeoloen morfologia aldaketak ikertzeko, parametro anitz kalkulatu ziren. Epitelioaren batez besteko lodiera (MET, mean epithelium thickness) eta lumeneko batez besteko erradioa (MLR, mean luminal radius) mikrometrotan neurtu ziren (μm), ondoren MLR/MET ratioa ($\mu\text{m}/\mu\text{m}$) kalkulatzeko. Horiez gain, dibertikuluaren batez besteko erradioa (MDR, mean diverticular radius) ere neurtu zen (μm), jarraian MET/MDR ratioa ($\mu\text{m}/\mu\text{m}$) kalkulatzeko (Vega *et al.*, 1989; Cajaraville *et al.*, 1990 eta 2006; Garmendia, *et al.*, 2011). Gainera, muskuiluen digestio guruineko zelula basofiloen bolumenaren dentsitatea (V_{BAS} , volume density of basophilic cells ($\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^3$)) zenbatetsi zen (Soto *et al.*, 2002). Halaber, digestio-dibertikuluak eta ehun konektibo interstizialak duten hedaduraren arabera digestio-guruinaren ehunaren osotasuna determinatu zen (CTD, connective to diverticula) (Brooks *et al.*, 2011; Garmendia *et al.*, 2011) (4. Irudia). Guzti horretarako, hurrengo ekuazioak erabili ziren (Cajaraville *et al.*, 1990; Brooks *et al.*, 2015):

$$\text{MDR} = \text{MLR} + \text{MET}$$

$$\text{CTD} = \frac{\text{Ehun konektiboaren agerraldi guztiak}}{\text{Digestio - dibertikuluaren agerraldi guztiak (zelula basofiloak + digestio - zelulak + lumenak)}}$$

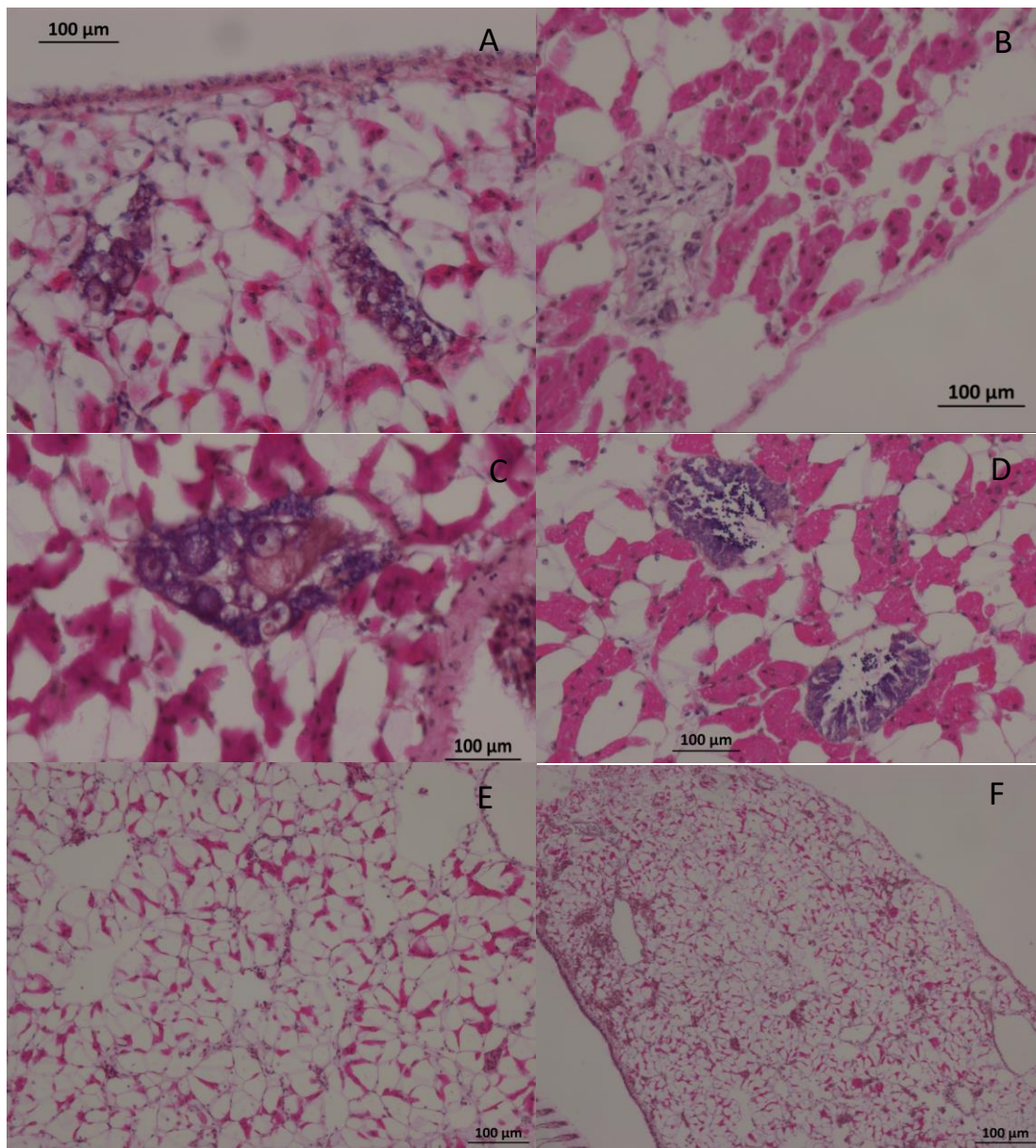
$$V_{\text{BAS}} = \frac{\text{Zelula basofiloen dentsitatea}}{\text{Zelula guztien kopurua (zelula basofiloak + digestio - zelulak)}}$$



4. Irudia. Digestio albeoloko parametroen irudi eskematikoa. MLR: lumeneko batez besteko erradioa, MET: epitelioaren batez besteko lodiera eta MDR: dibertikuluaren batez besteko erradioa. Ezkerreko argazkia *M. galloprovincialis* eta eskuinekoa *X. securis*.

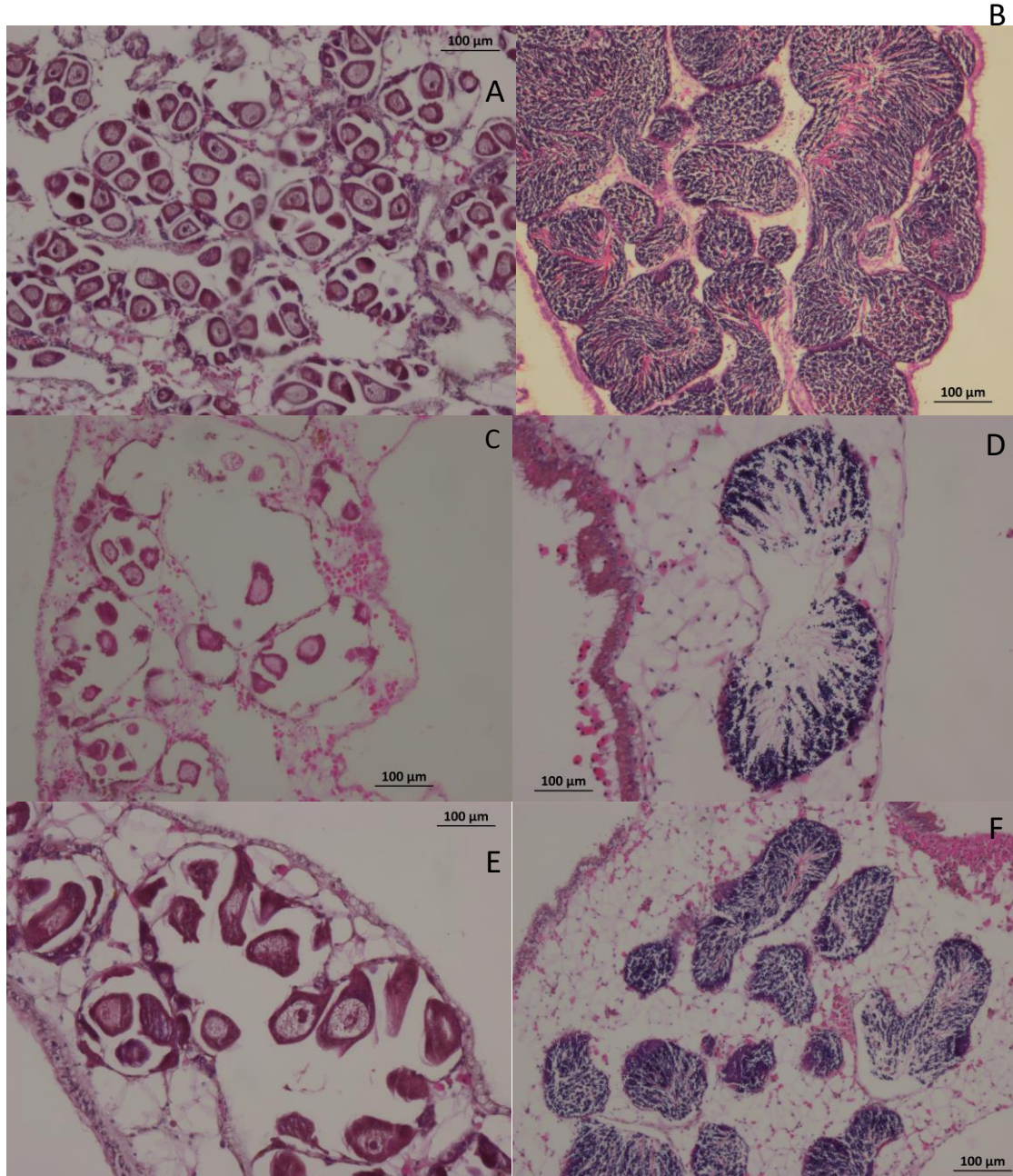
2.5. Sexu-ratioa, gametoen garapen faseak eta gonaden indizea

Muskuluen mantua erabili zen banakoen sexua, gametoen eta gonaden garapen faseak eta gonaden indizea (GI) zehazteko. Gametoen garapen faseak (sexualki desberdinu gabeak, garapen goiztiarra, erdi garatua, garapen berantiarra, guztiz garatua, errutea eta errute ostea) determinatu eta batetik zortzirainoko balioekin deskribatu ziren (1 = sexualki desberdinu gabea; 8 = errute ostea). Horrez gain, gonadak garapen faseetan sailkatu (atsedenean dagoen gonada, garapenean dagoen gonada, gonada heldua, erruten dagoen gonada) eta, horiek ere, zenbakizko balio batekin deskribatu ziren (0= atsedenean, 1-4 = garapenean, 5 = heldua, 4-1 = erruten), bakoitzari GI balio bat egokituz. Azkenik, talde esperimental bakoitzeko 20 muskuluren gonaden indizearen batezbestekoa kalkulatu zen (Seed, 1969; Kim *et al.*, 2006; Ortiz-Zarragoitia *et al.*, 2011, Azpeitia *et al.*, 2017) (5. Irudia eta 6. Irudia).



5. Irudia (aurreko orrian). *M. galloprovincialis* muskuluen hematxilina-eosinaz tindatutako gonadaren argazkiak. A) garatzen dagoen gonada emea (1. fasea), B) garatzen dagoen gonada arra (1.

fasea), C) garatzen dagoen gonada emea (2. fasea), D) errunaldian dagoen gonada arra (2. fasea), E) eta F) atsedenean dauden gonadak dira (0 fasea).



6. Irudia. *X. securis* muskuiluaren hematoxilina-eosinaz tindatutako gonadaren argazkiak. A) errunaldian dagoen gonada emea (3. fasea), B) guztiz heldua den gonada arra (5. fasea), C) errunaldian bukatzen dagoen gonada emea (2. fasea), D) errunaldian dagoen gonada arra (2. fasea), E) errunaldian dagoen gonada emea (2. fasea) eta F) errunaldian dagoen gonada arra (3. fasea).

2.6. Datuen analisia

Microsoft excel programa erabili zen biomarkatzaileen batezbestekoak eta desbideratze estandarrak kalkulatzeko, bai eta datu horiekin grafikoak egiteko ere. Horrez gain, sexu-ratioa eta atsedeneko indibiduo portzentajea ere atera ziren taulak egiteko. Gainera, gonaden indizea (GI) eta bere desbideratze estandarra kalkulatu ziren, ondoren, grafikoak egiteko.

Bestalde, estatistikari dagokionez, IBM® SPSS® Statistics ver. 25.0 (IBM Corp., Armonk, NY, USA). $V_{V_{BAS}}$, MET, MLR, MDR, MLR/MET, MET/MDR eta CTD ratioaren normaltasuna Kolmogorov-Smirnov testaren eta homogeneitatea Levene-ren testaren bidez probatu ziren. Jarraian, espezie bakoitzeko parametroak faktore bakarreko bariantzazko analisi estatistikoaren (ANOVA) bitartez aztertu ziren eta desberdintasun esangarria lortutako kasuetan, Duncan-en testa burutu da desberdintasuna zein tratamenduen artean zegoen jakiteko. Espezie bien biomarkatzaileen datuak konparatzeko, Student-en lagin independenteetarako t testa erabili zen. Sexu-ratioa, muskuilu ar eta emeen guztizko kantitatea, Kharratu testaren bidez aztertu zen. % 95eko esangura-maila ($p < 0,05$) finkatu zen analisi estatistiko guztietan.

3. EMAITZAK

3.1. Ehun mailako biomarkatzaileen ikerketa

Zelula basofiloen bolumenaren dentsitatea ($V_{V_{BAS}}$), MLR/MET ratioa, MET/MDR ratioa eta ehun konektiboaren eta dibertikuluen arteko erlazioa (CTD) azpiko irudian (7. Irudia) ikus daitezke. Analisi estatistikoetan lortutako balioak aurkezten dira (1. Taula eta 2. Taula).

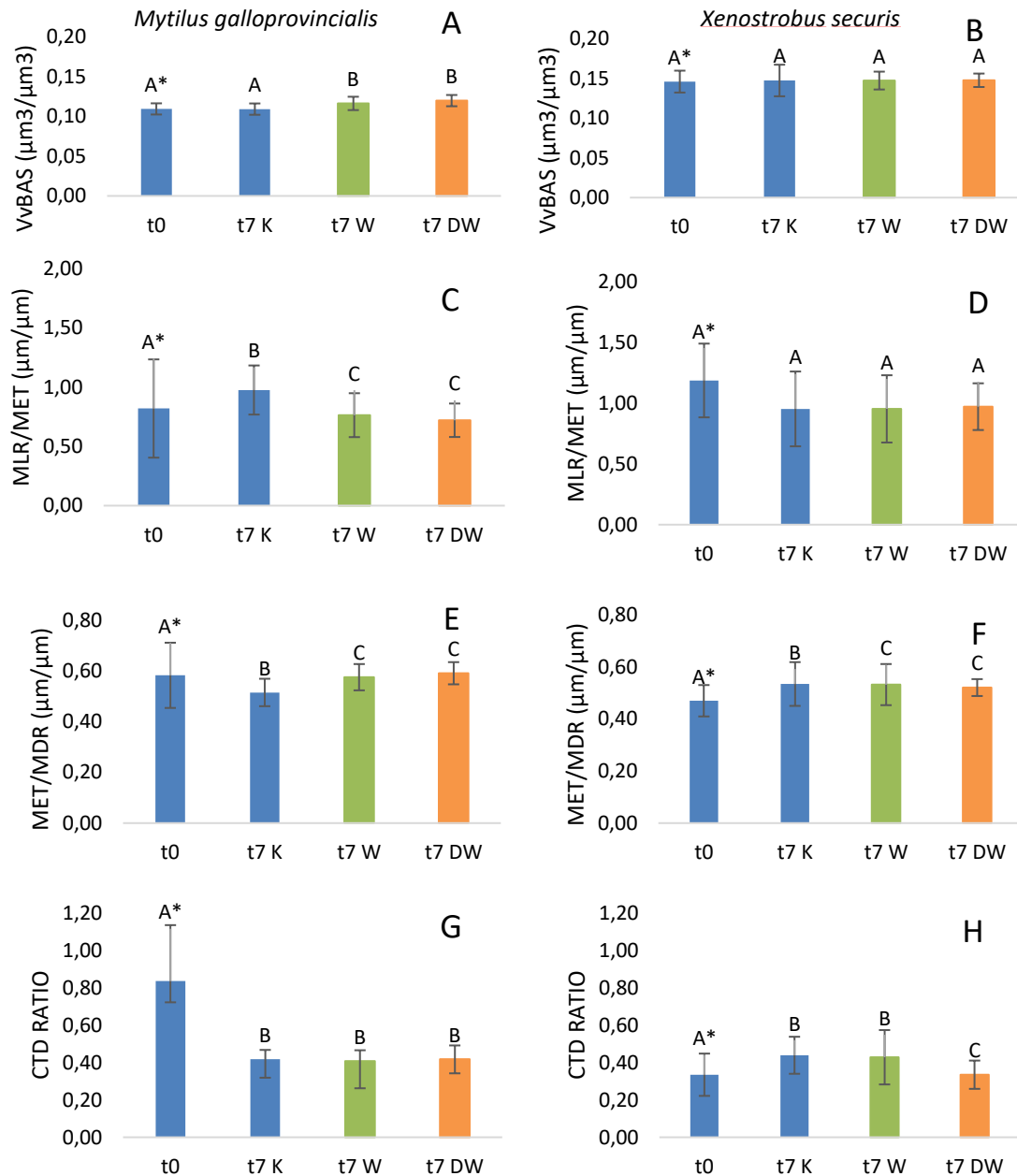
Bi muskuilu espezieen liseri-epitelikoko zelula basofiloen proportzio erlatiboak ($V_{V_{BAS}}$), esperimenduaren hasieran (t_0), espezieen arteko desberdintasun esangarria erakusten du ($p < 0,05$). Hori kuantitatiboki ere ikus daiteke, *X. securis* espezieko muskuiluek *M. galloprovincialis* muskuiluak baino oinarritzko $V_{V_{BAS}}$ altuagoa erakusten dutelako ($0,1459 > 0,1095 \mu\text{m}^3/\mu\text{m}^3$). Espezie bakoitzean, 0 eta 7 egunetako kontrolen (t_0 eta t_7K) $V_{V_{BAS}}$ -ek ez dute desberdintasun esangarririk erakusten beraien artean, ez *X. securis*-en kasuan ($0,1459$ eta $0,1473 \mu\text{m}^3/\mu\text{m}^3$), ezta *M. galloprovincialis* muskuiluan ($0,1095$ eta $0,1093 \mu\text{m}^3/\mu\text{m}^3$) ere. Kutsatzaileen eraginpean 7 egunez egondako *X. securis* muskuiluak (t_7W eta t_7DW) espezie bereko kontrolekin (t_7K) konparatuta, ez da desberdintasun esangarririk ($p > 0,005$) ikusten $V_{V_{BAS}}$ biomarkatzaileari dagokionez. *M. galloprovincialis*-en ordea, t_7W eta t_7DW taldeen $V_{V_{BAS}}$ balioen handipen esangarria dago ($p < 0,05$) espezie bereko kontrolekin (t_7K) konparatuta (*M. galloprovincialis* 7A. Irudia eta *X. securis* 7B. Irudia).

Muskuiluen MLR/MET proportzioak, esperimenduaren hasieran (t_0), espezieen arteko desberdintasun esangarria erakusten du ($p < 0,05$). Hori kuantitatiboki ere ikus daiteke, *X. securis* espezieko muskuiluek *M. galloprovincialis* muskuiluak baino MLR/MET proportzio altuagoa erakusten dutelako ($1,1855 > 0,8186 \mu\text{m}/\mu\text{m}$). Espezie bakoitzean, *X. securis*-en kasuan, 0 eta 7 egunetako kontrolen (t_0 eta t_7K) MLR/MET proportzioek ($1,1855$ eta $0,9516 \mu\text{m}/\mu\text{m}$) ez dute desberdintasun esangarririk erakusten beraien artean ($p > 0,05$). Kutsatzaileen eraginpean 7 egunez egondako *X. securis*

muskuiluak (t7W eta t7DW) espezie bereko kontrolekin (t7K) konparatuta, ez da ezta desberdintasun esangarririk ($p > 0,005$) ikusten MLR/MET proportzioari dagokionez. *M. galloprovincialis* muskuiluan, 0 eta 7 egunetako kontrolen (t0 eta t7K) MLR/MET proportzioek (0,8186 eta 0,9748 $\mu\text{m}/\mu\text{m}$) desberdintasun esangarria erakusten dute beraien artean ($p < 0,05$). Kutsatzaileen eraginpean 7 egunez egondako *M. galloprovincialis*-etan, t7W eta t7DW taldeen MLR/MET proportzioen jaitsiera esangarria dago ($p < 0,05$) espezie bereko kontrolekin (t7K) konparatuta (*M. galloprovincialis* 7C. Irudia eta *X. securis* 7D. Irudia).

MET/MDR proportzioak, esperimentuaren hasieran (t0), espezieen arteko desberdintasun esangarria erakusten du ($p < 0,05$). Hori kuantitatiboki ere ikus daiteke, *X. securis* espezieko muskuiluek *M. galloprovincialis* muskuiluak baino MLR/MET proportzio baxuagoa erakusten dutelako (0,4702 < 0,5818 $\mu\text{m}/\mu\text{m}$). Espezie bakoitzean, *X. securis*-en kasuan, 0 eta 7 egunetako kontrolen (t0 eta t7K) MET/MDR proportzioek (0,4702 eta 0,5346 $\mu\text{m}/\mu\text{m}$) desberdintasun esangarria erakusten dute beraien artean ($p < 0,05$). Kutsatzaileen eraginpean 7 egunez egondako *X. securis* muskuiluak (t7W eta t7DW) espezie bereko kontrolekin (t7K) konparatuta, handipen esangarria ($p < 0,005$) ikusten da MET/MDR proportzioari dagokionez. *M. galloprovincialis* muskuiluan, 0 eta 7 egunetako kontrolen (t0 eta t7K) MET/MDR proportzioek (0,5818 eta 0,5144 $\mu\text{m}/\mu\text{m}$) desberdintasun esangarria erakusten dute beraien artean ($p < 0,05$). Kutsatzaileen eraginpean 7 egunez egondako *M. galloprovincialis*-etan, t7W eta t7DW taldeen MLR/MET proportzioen handipen esangarria dago ($p < 0,05$) espezie bereko kontrolekin (t7K) konparatuta (*M. galloprovincialis* 7E. Irudia eta *X. securis* 7F. Irudia).

CTD ratioak, esperimentuaren hasieran (t0), espezieen arteko desberdintasun esangarria erakusten du ($p < 0,05$). Hori kuantitatiboki ere ikus daiteke, *X. securis* espezieko muskuiluek *M. galloprovincialis* muskuiluak baino MLR/MET proportzio baxuagoa erakusten dutelako (0,3342 < 0,8343 $\mu\text{m}/\mu\text{m}$). Espezie bakoitzean, *X. securis*-en kasuan, 0 eta 7 egunetako kontrolen (t0 eta t7K) CTD ratioek (0,3342 eta 0,4382 $\mu\text{m}/\mu\text{m}$) desberdintasun esangarria erakusten dute beraien artean ($p < 0,05$). Kutsatzaileen eraginpean 7 egunez egondako *X. securis* muskuiluak (t7W eta t7DW) espezie bereko kontrolekin (t7K) konparatuta, esangarritasun desberdina erakusten dute CTD ratioari dagokionez. Izan ere, t7W muskuiluak t7K-koekin konparatuz gero, ez da desberdintasun esangarririk ($p > 0,05$) ikusten. Baina, t7DW muskuiluak t7K-koekin konparatuz gero, jaitsiera esangarria ($p < 0,005$) ikusten da. *M. galloprovincialis* muskuiluan, 0 eta 7 egunetako kontrolen (t0 eta t7K) CTD ratioek (0,8343 eta 0,4172 $\mu\text{m}/\mu\text{m}$) desberdintasun esangarria erakusten dute beraien artean ($p < 0,05$). Kutsatzaileen eraginpean 7 egunez egondako *M. galloprovincialis*-etan, ez dago t7W eta t7DW taldeen CTD ratioaren desberdintasun esangarririk ($p > 0,05$) espezie bereko kontrolekin (t7K) konparatuta (*M. galloprovincialis* 7G. Irudia eta *X. securis* 7H. Irudia).



7. Irudia. Zelula basofiolen bolumenaren dentsitatea (V_{vBAS}) (A: *M. galloprovincialis* eta B: *X. securis*), MLR/MET ratioa (lumeneko batez besteko erradioaren eta epitelioaren batez besteko lodieraren arteko erlazioa) (C: *M. galloprovincialis* eta D: *X. securis*), MET/MDR ratioa (epitelioaren batez besteko lodieraren eta dibertikuletako batez besteko erradioaren arteko erlazioa) (E: *M. galloprovincialis* eta F: *X. securis*) eta CTD ratioa (ehun konektiboaren eta dibertikuluen arteko erlazioa) (G: *M. galloprovincialis* eta H: *X. securis*). Tartek desbideratze estandarra adierazten dute, letrek Duncan testaren arabeko talde esperimentalen arteko desberdintasun esangarria ($p < 0,05$) adierazten dute eta izartxoek bi espezieen arteko Stundet-en t testaren arabeko t0-ko desberdintasun esangarria ($p < 0,05$) adierazten dute (t0, t7Kontrola, t7WAF25 eta t7D+WAF5).

1. Taula. *Mytilus galloprovincialis*-ren eta *Xenostrobus securis*-en biomarkatzaileen balioekin estadistika egitean lortutako datuak.

Biomarkatzailea	<i>M. galloprovincialis</i> -en N=120		<i>X. securis</i> -en N=120	
	ANOVA		ANOVA	
	F	p	F	p
V _V BAS	6,942	0,000244	0,055	0,983
MLR/MET	4,198	0,007	2,549	0,059
MET/MDR	4,392	0,006	3,143	0,028
CTD RATIOA	26,151	5,3996x10 ⁻¹³	4,010	0,009

2. Taula. *Mytilus galloprovincialis* eta *Xenostrobus securis*-en biomarkatzaileen t0 balioak konparatzean lortutako datuak.

M. GALLO VS X. SEC	NORMALTASUNA : KOLMOGOROV- SMIRNOV TESTA	HOMOGENEITATEA LEVENE-REN TESTA			STUDENT-EN T TESTA		
		F	p	Bariantzak	t	p	
N = 30 + 30							
V _V BAS	Banaketa normala	4,374	0,041	desberdinak	52,072	5,3847 x10 ⁻¹³	Desberdintasun esangarria
MLR/MET	Banaketa normala	1,865	0,177	berdinak	-3,460	0,001	Desberdintasun esangarria
MET/MDR	Banaketa normala	12,472	0,001	desberdinak	3,835	0,000385	Desberdintasun esangarria
CTD RATIOA	Banaketa normala	0,319	0,576	berdinak	-0,551	0,05	Desberdintasun esangarria

3.2. Sexu-ratioa, gametoen hazkuntza faseak eta gonaden indizea

Denbora eta tratamendu bakoitzean lagindutako muskuiluen sexu-ratioa eta atsedenean dauden indibiduen ehunekoa ikus daitezke azpiko bi tauletan, bakoitza espezie bati dagokiolarik: lehenengoan *M. galloprovincialis*-en datuak daude (3. Taula) eta bigarrenean *X. securis*-enak (4. Taula).

M. galloprovincialis-en sexu-ratioa nahiko antzekoa da t0, t7K eta t7DW-ren kasuan (0,222; 0,273; 0,286), baina nahiko desberdina t7W-n (0,571). Gainera, χ^2 testa eginez lortzen den esangura-maila 0,72koa denez ($p > 0,05$), ez da ar eta eme arteko aldaketarik antzeman denbora eta tratamendu desberdinetan. Atsedeneko indibiduen portzentajeari dagokionez, t7K esposizioan da baxuena (% 30), t0 eta t7W-n zertxobait altuagoa da (% 45) eta t7DW-n, berriz, baliorik altuena (% 55) dauka. Izan ere, kontuan hartu behar da indibiduen kopururik gehiena atsedenean daudela. Hortaz, muskuiluen sexu behinena zein den ezin izan da egokiro jakin, nahiz eta lan honetan emeak gehiago diren.

X. securis-en sexu-ratio berdina beha daiteke t0 eta t7DW kasuetarako (0,429). t7K esposizioan, aldiz, proportzioa bi horiena baino baxuagoa da (0,357) eta t7W-n altuagoa (0,538). Kontuan izan behar da, t7K 7 indibidua falta dela. Gainera, χ^2 testa eginez lortzen den esangura-maila 0,95ekoa denez ($p > 0,05$), ez da ar eta eme arteko aldaketarik antzeman denbora eta tratamendu desberdinetan. Bestalde, ikus daitekeenez, *X. securis*-en kasuan, ez da atsedenean zegoen indibiduorik agertu. Esan daiteke muskuilu espezie honetan emeak direla nagusi.

Bi espezieen konparaketari dagokionez, bai kuantitatiboki bai estatistikoki desberdintasun esangarriak ($p < 0,05$) daude.

Azkenik, aipatu beharra dago, ikerketan zehar ez zela indibiduo intersexualik, hau da, bi sexuetoako gametoak zituen indibiduorik, aurkitu.

3. Taula. Denbora eta tratamendu desberdinetako *Mytilus galloprovincialis* muskuiluaren ar eta eme proportzioa, bai eta atsedenean dauden indibiduen kantitatea ere, erakusten duen taula. Gainera, χ^2 testa eginez lortutako emaitza ere ageri da.

Mytilus galloprovincialis

	t0	t7			GUZTIRA
		K	W	DW	
AR	2	3	4	2	11
EME	9	11	7	7	34
ATSEDENEAN	9	6	9	11	35
Sexu-ratioa (ar/eme)	0,222	0,273	0,571	0,286	0,324
Atsedeneko %	45	30	45	55	43,75
$\chi^2 \rightarrow p$		0,72			-

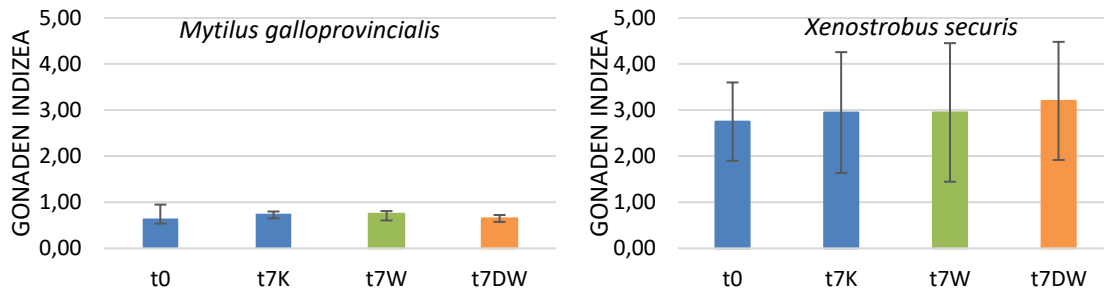
4. Taula. Denbora eta tratamendu desberdinetako *Xenostrobus securis* muskuiluaren ar eta eme proportzioa, bai eta atsedenean dauden indibiduen kantitatea ere, erakusten duen taula. Gainera, χ^2 testa eginez lortutako emaitza ere ageri da. Bestalde, t7K 7 indibidua ezin izan da aztertu.

Xenostrobus securis

	t0	t7			GUZTIRA
		K	W	DW	
AR	6	5	7	6	24
EME	14	14	13	14	55
ATSEDENEAN	0	0	0	0	0
Sexu-ratioa (ar/eme)	0,429	0,357	0,538	0,429	0,436
Atsedeneko %	0	0	0	0	0
$\chi^2 \rightarrow p$		0,950			-

***t7 K 7 falta da**

Mikroskopio bidez behatutako espezieen eta tratamenduen arteko desberdintasunak muskuiluen gonaden eta horietan garatzen diren gametoen hazkuntzan (5. Irudia eta 6. Irudia). *M. galloprovincialis*-en kasuan, gonaden indizeak 0,65 eta 0,75 arteko balioak erakusten ditu. *X. securis*-en grafikoak aldiz, balio nabarmeki altuagoak adierazten ditu, 2,75 eta 3,20 tartekoak (8. Irudia).



8. Irudia. Muskuiluen gonaden indizea (GI), gametoen hazkuntza adierazteko. Ezkerrekoa *M. galloprovincialis* eta eskuinekoa *X. securis*. Tarteek desbideratze estandarra adierazten dute eta koloreek (urdina, berdea eta laranja) tratamenduak adierazten dituzte (kontrola, WAF25 eta D+WAF5).

4. EZTABAIDA

Lan honetan zehar bi muskuilu espezieren, Arrigunagan bildutako *Mytilus galloprovincialis*-en eta San Ignazion hartutako *Xenostrobus securis*-en, petrolio gordinaren (WAF) eta petrolio gordinaren eta sakabanatzailearen arteko nahastearen (D+WAF) aurreko esposizioaren ondorioz garatutako erantzun biologikoa nolakoa den jakiteko, ehun mailako zenbait biomarkatzaile ikertu dira: $V_{V_{BAS}}$, MET, MLR, MDR, MLR/MET, MET/MDR eta CTD ratioa. Biomarkatzaile horiek ohikoak dira petrolioak muskuiluetan dituen eraginak ikertzeko (Marigómez et al., 2004).

Biomarkatzaileez gain, sexu-ratioa, gametoen hazkuntza faseak eta gonaden indizea (GI) ere ikertu ziren. Izan ere, sexuen-proportzioaren aldaketa (1:1-etik beste balio batzuetara) kutsatzaileen esposizioaren arabera alda daitekeela uste da. Saiakuntza honetan zehar aztertutako muskuiluen kasuan, proportzioa ez zen WAF25 eta D+WAF5-ren esposizioaren arabera aldatu. Bi espezieen kasuan, ez zen t0-ko proportzioa 1:1 izan. *X. securis* espeziean, t0-tik t7W-ra pixka bat igo da eta t0-tik t7DW-ra, aldiz, konstante mantendu da. *M. galloprovincialis*-en kasuan, sexu-ratioa t0-tik t7W-ra nabarmen igo dela ikusi da, baina t0-tik t7DW-ra nahiko antzeko mantendu da. Bigarren muskuilu espezie horretan, indibiduo asko atsedenean aurkitu ziren. Hori dela eta, faktore hori izan daiteke aurkitu den aldaketa txikiaren eragilea. Ikerketa honetan, ezin daiteke esan esposizioengatik aldatu dela sexu-ratioa. Gonaden indizeak ondorio horiek indartu zituen, *M. galloprovincialis*-en grafikoak errunaldiaren osteko eta atsedeneko faseak islatzen baititu eta *X. securis*-enak, aldiz, hazkuntzako faseak (Orbea et al., 2006; Garmendia et al., 2010). Bestalde, ikusten da kutsatzaileen aurreko erantzunak desberdinak direla gonadaren garapen fase desberdinetan. Hori dela eta, espezieak nahastuz gero, arazoak egon daitezke estres aurreko erantzun egokiak interpretatzeko orduan.

Mytilus galloprovincialis espezieko muskuiluetan normalean, azaro eta abendu tartean gonadak guztiz helduta eta erruteko prest egoten dira (Ortiz-Zarragoitia et al., 2011). Baina esperimendu honetan ikertutako indibiduoak errunaldiaren osteko eta atsedeneko faseetan zeuden. Horrek esan nahi du, beraien gonaden garapena sasoiez kanpo dagoela. Hori beraien habitateko uraren tenperaturengatik (bildu

zirenean 16°C) zein uretako kutsatzaileengatik izan daiteke, hau da, estres baldintzak pairatzeagatik. *X. securis*-i dagokionez, nahiz eta muskuilu helduak eurihaloak izan (1-32 PSU), larbak soilik 17,5 PSU-tik behera bizi daitezke. Hori dela eta, helduek ugaltze-zikloa erregula dezakete eta gazitasuna egokia denean gametoak askatu (Wilson, 1969). Hortaz, lan honetan erabilitako muskuiluak garapen faseetan zeudenez, esan daiteke kanpo baldintzak guztiz faboragarriak ez zirela, 22 PSU-ko uretan bildu baitziren.

Ehun mailako biomarkatzaileei dagokionez, V_{VBAS} balioek saiakuntzaren hasieran *M. galloprovincialis* indibiduok osasuntsu zeudela adierazten dute ($0,1095 \mu\text{m}^3/\mu\text{m}^3$) (Garmendia *et al.*, 2011). *X. securis* espeziean, ordea, balio pixka bat altuagoa zuten muskuiluek ($0,1459 \mu\text{m}^3/\mu\text{m}^3$), balio hori osasuntsutzat jo da, nahiz eta espezie horren daturik momentuz existitzen ez den. Espero zen bezala, bi muskuiluen kasuan, zelula basofiloen bolumenaren dentsitatea ez zen ia ezer aldatu kontrol taldean, nahiz eta 7 egun igaro (*M. galloprovincialis*: $0,1093 \mu\text{m}^3/\mu\text{m}^3$ eta *X. securis*: $0,1473 \mu\text{m}^3/\mu\text{m}^3$). Petrolio gordinaren (WAF) eta petrolio gordinaren eta sakabanatzailearen arteko nahastearen (D+WAF) aurreko esposizioaren ondorioz, *M. galloprovincialis*-en V_{VBAS} balioek gora egin zuten ($0,1165$ eta $0,1200 \mu\text{m}^3/\mu\text{m}^3$) kutsatzaileekiko erantzun mekanismo gisa. Hori dela eta, muskuiluen osasunak behera egin zuela esan daiteke (Garmendia *et al.*, 2010). Hortaz, 7 egunez kutsatzaileen esposizioan egotea nahikoa da espezie horretako muskuiluek estresa pairatzeko eta horri aurre egiteko baliabideak martxan jartzeko. *X. securis*-en kasuan aldiz, V_{VBAS} balioek ez dute gora egin, nahiko konstante mantendu dira ($0,1473$ eta $0,1476 \mu\text{m}^3/\mu\text{m}^3$). Beraz, izan liteke muskuilu espezie horrek toxikotasunarekiko tolerantzia gehiago izatea, hau da, kutsatzaileen kontzentrazio altuagoen aurrean arazorik gabe, egoki, bizi ahal izatea. Ondorioz, kutsatzaileekiko erantzun mekanismoak aktibatzeak kutsatzaile kontzentrazio altuagoetan mantendu behar izatea. Bestalde, izan liteke ere, epe laburrean kutsatzailez inguratuta biziraun ahal izatea. Hortaz, horiekiko esposizio denbora luzeagoa behar izatea mekanismoak martxan jartzeko (Barbieri *et al.*, 2011).

MLR/MET proportzioari dagokionez, *X. securis* espezieko muskuiluek, aurreko parametroarekin gertatu bezala, ia-ia konstante mantendu dute esposizio denbora eta tratamendu guztietan zehar ($1,1855$; $0,9516$; $0,9519$ eta $0,9701 \mu\text{m}/\mu\text{m}$). Horrek muskuilu horien epitelioaren lodieran edo lumenaren erradioan, edo bietan, aldaketarik egon ez dela adierazten du. Hala ere, izan liteke bi parametroak proportzionalki aldatzea, eta beraz MLR/MET proportzioa konstante mantentzea (Cajaraville *et al.*, 1990). Saiakuntzan zehar ikertutako *X. securis*-en kasuan, ez da epitelioaren lodieran aldaketarik behatu. *M. galloprovincialis*-en kasuan, MLT/MET proportzioa bai aldatu da, WAF eta D+WAF-ren esposizioaren aurrean proportzioa txikitu egin delarik. Muskuilu horien kasuan, epitelioaren lodiera handitu eta lumenaren erradioa txikitu da. Cajaraville-ren arabera, hori ez da ohikoa. Izatez, normalean, guztiz kontrakoa gertatzen da, epitelioaren lodiera txikitzea eta lumenaren erradioa handitzea. Hortaz, kasu honetan, agian, liseri zelulak txikitu direnean, zelula basofiloek horiek libre utziriko guneak bete dituzte. Hau da, kutsatzaileei aurre egiteko zelula basofiloen tamaina handitu da epitelioaren lodiera handitu delarik. Hala ere, izan liteke esposizio denbora luzeagoa mantenduz gero, ohiko erantzuna lortzea.

Bestalde, MET/MDR proportzioko balioei erreparatuz, emaitza guztiz desberdinak lortu dira. Izan ere, bi espezieen kasuan, proportzioak gora egin baitu kutsatzaileekiko esposizioarekin. *M. galloprovincialis* muskuiluetan, aurreko atalean aipatu bezala, kutsatzaileekiko esposizioaren aurrean

epitelioaren lodiera handitu da. Hori dela eta, MET/MDR proportzioa igo egin da MET igotzeagatik. Hala ere, esan beharra dago, MDR ere zertxobait handitu dela, baina inola ere ez MET bezain beste. *X. securis*-en kasuan, esan bezala, proportzioak ere gora egin du. Izan ere, MDR balioak, hau da, dibertikuluen erradioak, txikitu egin dira.

Azkenik, CTD ratioa ere aldatu egin da bi muskuilu espezieetan. Digestio epitelioaren lodieraren, zelula moten kantitatearen, dibertikuluen erradioen... aldaketek CTD ratioan eragina dute, hori goratuz zein beheratuz. *M. galloprovincialis* muskuiluen CTD ratioa jaitsi egin da kutsatzaileen esposizioarekin, espero zenaren kontrara. CTD ratioaren igotzeak muskuilua baldintza estresagarrietan egon dela adierazten baitu (Garmendia *et al.*, 2011). Hori jasotako elikagaiengatik izan liteke. Izan ere, muskuiluak Arrigunaga inguruan bildu ziren eta, beraz, giza jardueraren ondorioak pairatzen zituzten beraien habitatean zeudenean. Hortaz, akuarioetara pasatzean eta mikroalgaz egindako elikagaia eskaintzean, janari horrekiko ohitura falta dela eta, estresa paratu ahal izan dute. Horrez gain, izan liteke ere, esperimentua burutzean, ohituta zeuden baino janari gutxiago eskura izatea. *X. securis*-en kasuan aldiz, emaitza bitxiak lortu dira. Izan ere, t7W-ren kasuan CTD ratioak gora egin du, baina t7DW-ren kasuan behera.

Laburbilduz, bi muskuilu espezieen ehun mailako biomarkatzaileek zein sexu-ratioak eta gonaden indizeak balio oso desberdinak adierazten dituzte, esperimentuaren lehenengo momentutik (t0). Hau da, ehun-mailako ezberdintasunak dituzte kutsatzaileen eragina baino lehenago. Beraz, zentzuzkoa da aldaketa desberdinak pairatu izana. *Xenostrobis securis* inbaditzailea izanda, askoz toleranteagoa da baldintza desegokien aurrean; ez soilik kutsatzaileen aurrean, baizik eta gazitasun desberdinen aurrean ere. Hori dela eta, gai da habitat asko kolonizatzeke eta bertoko espezie autoktonoekin lehiatzean gailentzeko.

5. ONDORIOAK

- Ehun-mailako biomarkatzaileak egokiak dira kutsatzaileek sortutako eraginak aztertzeke.
- Ikertutako bi espezieen biomarkatzaileen balioak eta horien aldaketak guztiz desberdinak dira.
- D+WAF-k estres handiago sortzen du muskuiluetan epe labur batetan WAF-k baino.
- *Xenostrobis securis* espezie inbaditzaileak tolerantzia handiagoa dauka kutsatzaileen aurrean. Hori dela eta, ezin da kutsaduraren indikatzaile gisa erabili eta ez da espezie egokia izango kutsadura azterketetan.
- Sexu-ratioa eta gonaden indizea ez da aldatu WAF25 eta D+WAF5-ren esposizioaren aurrean, saiakuntza honetan erabilitako kontzentrazioetan. Agian beste petrolio eta sakabanatzaile kontzentrazio batzuk erabiliz gero, aldaketak gerta daitezke.
- Gai honi buruzko ikerketa sakonagoak egitea gomendatzen da, epe luzekoak zehazki, epe laburrera gertatutako aldaketak epe luzean mantentzen diren edo muskuiluek aklimatzea eta hasierako egoerara bueltatzea lortzen duten aztertzeke.

6. ESKER ONAK

Eskerrak eman nahi dizkiet lan hau aurrera eramaten lagundu didaten guztiei. Lehenik eta behi, eskerrak eman nahi dizkiet nire zuzendari izandako Urtzi Izagirre eta Xabier Lekuberi, lan hau egiteko aukeragatik, eta haien laguntza eta bultzadagatik. Eskerrak eman nahi dizkiet ere Irune Valenciano eta Javier Rafael Aguirreri, beti laguntzeko prest egoteagatik bereziki, eta laborategian erakutsitako guztiagatik. PiE-UPV/EHU-n izan ditudan kide guztiei ere eskerrak eman nahi dizkiet, nirekin hain jator portatzeagatik, eta haien laguntza eskaintzeagatik. Azkenik, nire familiari ere eskerrak eman nahi dizkiot, emandako laguntza hain garrantzitsua izanik.

7. BIBLIOGRAFIA

- Azpeitia, K., Ortiz-Zarragoitia, M., Revilla, M., & Mendiola, D. (2017). Variability of the reproductive cycle in estuarine and coastal populations of the mussel *Mytilus galloprovincialis* Lmk. from the SE Bay of Biscay (Basque Country). *International Aquatic Research*, 9, 329-350.
- Barbieri, M., Maltagliati, F., Di Giuseppe, G., Cossu, P., Lardicci, C., & Castelli, A. (2011). New records of the pygmy mussel *Xenostrobus securis* (Bivalvia: Mytilidae) in brackish-water biotopes of the western Mediterranean provide evidence of its invasive potential. *Marine Biological Association of the United Kingdom, Marine Biodiversity Records*, 4, e48.
- Blanco-Rayon, E. "Contribution to the development of Best Available Practices (BAPs) for a multi-biomarker approach in sentinel mussels based on a better understanding of the influence of confounding factors on biomarker values and responsiveness" PhD Thesis, University of the Basque Country, 2018.
- Branch, G. M., Branch, M. L., Griffiths, C. L., & Beckley, L. E. (2005). *Two Oceans: a guide to the marine life of southern Africa*. Cape Town, South Africa: Struik Nature. ISBN 0-86486-672-0.
- Brooks, S., Harman, C., Zaldibar, B., Izagirre, U., Glette, T., & Marigómez, I. (2011). Integrated biomarker assessment of the effects exerted by treated produced water from an onshore natural gas processing plant in the North Sea on the mussel *Mytilus edulis*. *Marine pollution bulletin*, 62(2), 327-339.
- Brooks, S. J., Harman, C., Hultman, M. T., & Berge, J. A. (2015). Integrated biomarker assessment of the effects of tailing discharges from an iron ore mine using blue mussels (*Mytilus spp.*). *Science of the Total Environment*, 524, 104-114.
- Cajaraville, M. P., Diez, G., Marigómez, J. A., & Angulo, E. (1990). Responses of basophilic cells of the digestive gland of mussels to petroleum hydrocarbon exposure. *Diseases of Aquatic Organisms*, 9, 221-228.
- Cajaraville, M. P., Garmendia, L., Orbea, A., Werding, R., Gómez-Mendikute, A., Izagirre, U. & Marigómez, I. (2006). Signs of recovery of mussel's health two years after the Prestige oil spill. *Marine environmental research*, 62, 337-341.

- Cappello, T., Mauceri, A., Corsaro, C., Maisano, M., Parrino, V., Paro, G. L., & Fasulo, S. (2013). Impact of environmental pollution on caged mussels *Mytilus galloprovincialis* using NMR-based metabolomics. *Marine pollution bulletin*, 77(1), 132-139.
- Counihan, K. L. (2018). The physiological effects of oil, dispersant and dispersed oil on the bay mussel, *Mytilus trossulus*, in Arctic/Subarctic conditions. *Aquatic Toxicology*, 199(February), 220–231.
- Depledge, M. H., Harvey, A. J., Brownlee, C., Frost, M., Moore, M. N., & Fleming, L. E. (2013). Changing views of the interconnections between the Oceans and Human Health in Europe. *Microbial ecology*, 65(4), 852-859.
- Eusko Jaurlaritzak/ Gobierno Vasco. geoEuskadi <http://www.geo.euskadi.eus/s69-15375/eu> (2019ko ekainaren 26an kontsultatuta).
- Faggio, C., Tsarpali, V., & Dailianis, S. (2018). Mussel digestive gland as a model tissue for assessing xenobiotics: An overview. *Science of the Total Environment*, 636, 220–229.
- Garci, M. E., Trigo, J. E., Pascual, S., González, A. F., Rocha, F., & Guerra, A. (2007). *Xenostrobus securis* (Lamarck, 1819) (Mollusca: Bivalvia): first report of an introduced species in Galician waters. *Journal of the European Aquaculture Society, Aquaculture International*, 15, 19-24.
- Garmendia, L., Soto, M., Cajaraville, M. P., & Marigómez, I. (2010). Seasonality in cell and tissue-level biomarkers in *Mytilus galloprovincialis*: relevance for long-term pollution monitoring. *Aquatic Biology*, 9(3), 203-219.
- Garmendia, L., Soto, M., Vicario, U., Kim, Y., Cajaraville, M. P., & Marigómez, I. (2011). Application of a battery of biomarkers in mussel digestive gland to assess long-term effects of the Prestige oil spill in Galicia and Bay of Biscay: tissue-level biomarkers and histopathology. *Journal of Environmental Monitoring*, 13(4), 915-932.
- Harrison G, & Lamont N. (2002). Simulated Time-based Studies to Evaluate Changes in Crude Oil Composition Through Evaporation and Biodegradation. *Oil and Hydrocarbon Spill III* (pp. 201-210). Wessex Institute of Technology Press, Ashurst Lodge, Southampton, UK. ISBN 1-85312-922-4
- Hilbish, T. J., Branock, P. M., Jones, K. R., Smith, A. B., Bullock, B. N., & Wethey, D. S. (2010). Historical changes in the distributions of invasive and endemic marine invertebrates are contrary to global warming predictions: the effects of decadal climate oscillations. *Journal of Biogeography*, 37(3), 423-431.
- Hook, S. E., Gallagher, E. P., & Batley, G. E. (2014). The role of biomarkers in the assessment of aquatic ecosystem health. *Integrated Environmental Assessment and Management*, 10(3), 327–341.
- IBM Corp. (2017). IBM SPSS Statistics for Windows, Version 25.0. Armonk, NY: IBM Corp.
- ICES. 2011. ICES / OSPAR SGIMC REPORT (2011) Monitoring of Contaminants and Biological Report of the Study Group on Integrated Effects (SGIMC) International Council for the Exploration of the Sea.
- Katolikova, M., Khaitov, V., Vainola, R., Gantsevich, M., & Strelkov, P. (2016). Genetic, ecological and morphological distinctness of the blue mussels *Mytilus trossulus* gould and *M. edulis* l. in the White Sea. *PLoS ONE*, 11(4), 1–25.

- Kim, Y., Ashton-Alcox, K. A., & Powell, E. N. (2006). Histological techniques for marine bivalve molluscs: update.
- Kimura, T., & Sekiguchi, H. (2009). Spatial and temporal patterns of abundance of the exotic mytilid *Xenostrobus securis* and the native mytilid *Musculista senhousia* in the Lake Hamana, Japan. *Journal of the Marine Biological Association, Marine Biodiversity Records*, 2, e89.
- Lekube, X. “Lysosomal biomarkers in mussel digestive cells: towards novel immunochemical approaches after the understanding of lysosomal responses to pollutants” PhD Thesis, University of the Basque Country, 2014.
- Lewis, C., Pook, C. & Galloway, T. (2008). Reproductive toxicity of the water accommodated fraction (WAF) of crude oil in the polychaetes *Arenicola marina* (L.) and *Nereis virens* (Sars). *Aquatic Toxicology*, 90:73-81.
- Luna-Acosta, A., Bustamante, P., Thomas-Guyon, H., Zaldibar, B., Izagirre, U., & Marigomez, I. (2017). Integrative biomarker assessment of the effects of chemically and mechanically dispersed crude oil in Pacific oysters, *Crassostrea gigas*. *Science of the Total Environment*, 598(42), 713–721.
- Ma, Y., Halsall, C. J., Xie, Z., Koetke, D., Mi, W., Ebinghaus, R. & Gao, G. (2017). Polycyclic aromatic hydrocarbons in ocean sediments from the North Pacific to the Arctic Ocean. *Environmental Pollution*, 227:498-504.
- Major, D., Derbes, R. S., Wang, H. & Roy-Engel, A. M. (2015). Effects of corexit oil dispersants and the WAF of dispersed oil on DNA damage and repair in cultured human bronchial airway cells, BEAS-2B. *Gene Reports*, 3:22-30.
- Marigómez, I., Soto, M., Orbea, A., Cancio, I., & Cajaraville, M. P. (2004). Biomonitoring of environmental pollution along the Basque coast, using molecular, cellular and tissue-level biomarkers: an integrative approach. *Oceanography and Marine Environment of the Basque Country, Elsevier Oceanography Series, Elsevier, Amsterdam*, 70, 335-364.
- Marigomez I., Garmendia L., Soto M., Orbea A., Izagirre U. & Cajaraville M.P. (2013). Marine ecosystem health status assessment through integrative biomarker indices: a comparative study after the Prestige oil spill “Mussel Watch”. *Ecotoxicology* 22, 486-505.
- Mathiesen, S. S., Thyrring, J., Hemmer-Hansen, J., Berge, J., Sukhotin, A., Leopold, P., ... & Nielsen, E. E. (2017). Genetic diversity and connectivity within *Mytilus* spp. in the subarctic and Arctic. *Evolutionary Applications*, 10(1), 39–55.
- Neff, J. M., Ostazesky, S., Gardiner, W. & Stejskal, I. (2000). Effects of weathering on the toxicity of three offshore Australian crude oils and a diesel fuel to marine animals. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 19(7):1809-1821.
- Ortiz-Zarragoitia, M., Garmendia, L., Barbero, M. C., Serrano, T., Marigómez, I., & Cajaraville, M. P. (2011). Effects of the fuel oil spilled by the Prestige tanker on reproduction parameters of wild mussel populations. *Journal of Environmental Monitoring*, 13(1), 84-94.
- Orbea, A., Garmendia, L., Marigómez, I., & Cajaraville, M. P. (2006). Effects of the ‘Prestige’ oil spill on cellular biomarkers in intertidal mussels: results of the first year of studies. *Marine Ecology Progress Series*, 306, 177-189.

- Owen, G. (1955). Observations on the Stomach and Digestive Diverticula of the Lamellibranchia: I. The Anisomyaria and Eulamellibranchia. *Quarterly Journal of Microscopical Science*, 33-96(36), 517-537.
- Pampanin, D. M., & Sydnes, M. O. (2013). Chapter 5: Polycyclic aromatic hydrocarbons a constituent of Petroleum: Presence and influence in the aquatic environment. *Hydrocarbon*, 83-118.
- Pascual, S., Villalba, A., Abollo, E., Garci, M., González, A. F., Nombela, M., Posada, D., & Guerra, A. (2010). The mussel *Xenostrobus securis*: a well-established alien invader in the Ria de Vigo (Spain, NE Atlantic). *Biological Invasions*, 12, 2091-2103.
- Seed, R. (1969). The ecology of *Mytilus edulis* L. (Lamellibranchiata) on exposed rocky shores. *Oecologia*, 3(3-4), 317-350.
- Soto M., Zaldibar B., Cancio I., Taylor M. G., Turner M., Morgan A. J., & Marigómez I. (2002). Subcellular distribution of cadmium and its cellular ligands in mussel digestive gland cells as revealed by combined autometallography and X-ray microprobe analysis. *The Histochemical Journal* 34, 273-280.
- Vega, M. M., Marigomez, J. A., & Angulo, E. (1989). Quantitative alterations in the structure of the digestive cell of *Littorina littorea* on exposure to cadmium. *Marine Biology*, 103(4), 547-553.
- Walther, H. R. (2014). Clean Up Techniques Used for Coastal Oil Spills: An Analysis of Spills Occurring in Santa Barbara, California, Prince William Sound, Alaska, the Sea of Japan and the Gulf Coast.
- Weibel, E. R. (1979). Practical methods for biological morphometry. London. Stereological methods, 1, 40-116.
- Widdows, J., Bakke, T., Bayne, B. L., Donkin, P., Livingstone, D. R., Lowe, D. M., ... & Moore, S. L. (1982). Responses of *Mytilus edulis* on exposure to the wateraccommodated fraction of North Sea oil. *Marine Biology*, 67(1), 15-31.
- Wilson, B. R. (1969) Survival and reproduction of the mussel *Xenostrobus securis* (Lamarck) (Mollusca; Bivalvia; Mytilidae) in a Western Australian estuary. Pt. II: Reproduction, growth and longevity. *Journal of Natural History*, 3 (1): 93-120.
- Wonham, M. J. (2004). Mini-review: Distribution of the Mediterranean mussel, *Mytilus galloprovincialis* (Bivalvia: Mytilidae), and hybrids in the northeast Pacific. *Journal of Shellfish Research*, 2, 535-543.
- Word, J. K. (2014). Environmental Impacts of Arctic Oil Spills and Arctic Spill Response Technologies. Literature Review and Recommendations. *Arctic Oil Spill Response Technology Joint Industry Programme*.
- Zaldibar, B., Cancio, I., & Marigómez, I. (2007). Reversible alterations in epithelial cell turnover in digestive gland of winkles (*Littorina littorea*) exposed to cadmium and their implications for biomarker measurements. *Aquatic toxicology*, 81(2), 183-196.
- Zorita, I., Apraiz, I., Ortiz-Zarragoitia, M., Orbea, A., Cancio, I., Soto, M. & Cajaraville, M. P. (2007). Assessment of biological effects of environmental pollution along the NW Mediterranean Sea using mussels as sentinel organisms. *Environmental pollution*, 148(1), 236-250.

8. ERANSKINAK

1. Erankina. Muskuiluentzako espezifikoa den ehunen prozesadoreko programa.

Disoluzioa	Iraupena (h)	Temperatura	Helburua
Etanol % 70	01:00		Deshidratazioa
Etanol % 96	01:00		
Etanol % 96	01:00		
Etanol absolutua	01:00		Garbiketa
Etanol absolutua	01:00		
IMS	01:00		
Xilenoa	01:00		
Xilenoa	01:00		
Parafina argizaria	02:00	60°C	Txertatzea
Parafina argizaria	02:00	60°C	
Parafina argizaria	02:00	60°C	

2. Erankina. Muskuiluentzako espezifikoa den hematoxilia-eosina tindaketa egiteko 14. programa.

Pausoak	Guneak	Denbora	Zehatza	Erreaktiboak
1	1	10:00	Ez	Xileno
2	2	10:00	Ez	Xileno
3	3	02:00	Ez	Alkohol absolutua
4	4	02:00	Ez	Alkohol absolutua
5	5	02:00	Ez	96°-ko alkohola
6	6	02:00	Ez	70°-ko alkohola
7	7	05:00	Ez	Ur distilatua
8	8	04:00	Bai	Hematoxilina
9	Garbitu 5	04:00	Ez	-
10	9	00:10	Bai	Alkohol azidoa
11	Garbitu 4	05:00	Ez	-
12	10	00:10	Bai	Litio karbonatoa
13	Garbitu 3	01:00	Ez	-
14	11	01:30	Bai	Eosina
15	Garbitu 2	00:01	Bai	-
16	Garbitu 1	01:30	Bai	-
17	-	-	-	-
18	13	00:05	Bai	70°-ko alkohola
19	14	00:10	Bai	96°-ko alkohola
20	15	00:15	Bai	Alkohol absolutua
21	16	00:20	Bai	Alkohol absolutua
22	17	01:00	Ez	Xilenoa
23	18	01:00	Ez	Xilenoa
24	Irteera			