

Gradu Amaierako Lana / Trabajo Fin de Grado
Biokimika eta Biologia Molekularreko Gradua / Grado en Bioquímica y Biología Molecular

Kobre kutsadura eta gazitasun aldakorreko baldintzetan izandako *Hediste diversicolor* itsas poliketoaren alterazio immunologiko eta histologikoak

Egilea/Autor/a:
Oneka Perea Ariznabarreta

Zuzendaria/Director/a:
Nerea Garcia Velasco
Beñat Zaldibar Aranburu

© 2020, se puede proteger poniendo "nombre y apellidos/izen abizenak" ezarriz babez zaitetzke edo Lizentzia CC batekin babestu/o con una Licencia CC:
<http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

AURKIBIDEA

1. SARRERA	3
1.1. Kobrea ingurumenean	3
1.2. <i>Hediste diversicolor</i> poliketoak.....	3
1.2.1. Ezaugarriak	4
1.2.2. Anatomia.....	4
1.2.3. Zeloma	4
1.2.4. Estuarioaren gazitasun aldaketak	5
2. MATERIAL ETA METODOAK	5
2.1. Sedimentuaren lorpena, tratamendua eta esperimentuaren muntaia	5
2.2. <i>Hediste diversicolor</i> poliketoak.....	6
2.3. Esperimentuaren garapena	6
2.4. Zelomaren erauzketa eta zelomozitoen bideragarritasuna (kaltzeina testa).....	6
2.5. Obozitoen zenbaketa, fixaketa eta diametroaren neurketa	7
2.6. Disekzioa, prestaketa histologikoa eta irudien analisisa.....	8
2.7. Analisi estatistikoak	8
3. EMAITZAK	8
3.1. Poliketoen hilkortasuna eta pisu galera	8
3.2. Zelomozitoen bideragarritasuna (kaltzeina testa).....	9
3.3. Obozitoen diametroa	10
3.4. Hematoxilina-Eosina tindaketa	11
3.4.1. Azterketa histopatologikoa	11
3.4.2. Digestio traktuaren altuera eta irregularitasuna	11
4. EZTABAIDA	12
5. ONDORIOAK	16
6. BIBLIOGRAFIA	16

1. SARRERA

Estuarioak kostaren eremuetako ekosistema inportanteenetarikoak dira, ur geza eta gazia nahasten diren ekoizpen biologiko altuko trantsizio eskualdeak baitira^{1,2}. Estuarioen sedimentuetan organismo anitzak bizi dira, sare trofikoaren maila ezberdinetakoak eta garrantzi ekonomiko handiko espezieak barne¹. Gainera, industria eta hiri-jardueraren eraginpean egonik, hainbat asaldura pairatu dituzte².

Estuarioetara heltzen diren kutsatzaile asko ur-zutabeen disolbatu eta itsasoan zehar barreiatzen diren bitartean, beste asko sedimentuetara atxikitzen dira³. Sedimentuek ezinbesteko papera betetzen dute itsas animalien toxikotasunean, kutsatzaile metaketa-gune nagusi eta ekosistemen kutsadura-iturri baitira^{2,4}. Hala, sedimentuekin harreman estuan bizi diren espezie bentikoek estres kimiko handia pairatzeko arriskua dute^{1,2}. Bada, kutsadurak sedimentuetan bizi diren ornogabeen osasunean eta estuarioetako ekosistemen ongizatean sor ditzakeen efektuak ikertzeak berebiziko premia du. Ondorioz, lan honetan, kostaldeko zenbait alderditan oparota den kobrea metal astunak *Hediste diversicolor* poliketorengan dituen eraginak ikertu dira, gazitasun ezberdinetan.

1.1. Kobrea ingurumenean

Gaur egungo itsas kutsaduraren arduradun nagusiak etxeko-hondakin, industria-hondakin, olio-hondakin, pestizida, intsektizida, hondakin erradioaktibo eta metalak dira⁵. Itsasoko uretan aurkitzen diren metal astunak jatorri natural zein artifizialekoak izan daitezke⁶. Azken urteotan gertatu den estuario inguruetako estres mailaren igoerak, gehiegizko metal kontzentrazioen metatzea ekarri du⁷.

Metalen barruan, kobrea ingurunerako arrisku akutu eta kronikoa suposatzen duen substantzia kronikoa da (Europar Batasuneko 2016/1179 araudian jasoa), batez ere organismo urtarrentzako kaltegarria⁸. Mendi-koniferoak kutsatutako *Dothistroma septosporum* eta *Dothistroma pini* onddoen infekzioaren aurka egiteko⁹, Bizkaia eta Gipuzkoako Foru Aldundiek %75 [WG] P/P kobrea (I) oxidoaren formularen oinarritutako produktu fitosanitarioak merkaturatu eta lurrian aplikatzeko zenbait jarraibide ezartzeko ebazpena argitaratu zuten^{10,11}. Honek kobrea iturri gehigarria suposatu du Euskal Autonomia Erkidegoko kostako estuarioetan. Kobrea (I) oxidoak solugarritasun baxua du uretan, baina pH azidoetan disolbagarriago bihurtzen da¹². Atmosferako CO₂ maila altuek eragindako ozeanoen azidifikazioa dela eta, sedimentuetako pHa baxua izan daiteke¹³. Egoera honetan, metalak forma ioniko aske gisa azaltzen dira sedimentuan eta ondorioz, kobrea bertan bizi diren organismoentzat eskuragarri egon daiteke^{5,13}.

1.2. *Hediste diversicolor* poliketokak

Hediste diversicolor kostalde eta estuarioetako habitat itsastarretako espezie nagusia da, eremu geografiko zabalean aurkitua^{3,14}. Gainera, ingurugiroko parametroen aldakortasunekiko (gazitasuna, tenperatura eta disolbatutako oxigenoaren kontzentrazioa) tolerantzia handia erakusten du^{5,14}. Halaber, paper garrantzitsua betetzen du estuarioko kate trofikoetan (krustazeo, arrain eta hegaztien elikagai iturria izanik), baita sedimentuetako organismo komunitateen antolaketan ere^{3,15}. Europa hego-kostaldekotako herrialdeetan baliabide ekonomiko inportantea ere bada, arrantzarako beita gisa duen erabilerrari esker^{15,16}.

H. diversicolor sedimentuan bizi da eta elikatze modu anitzak balia ditzakeen arren, eskuarki, iragazki eta elikagai-biltegi modura jokatzen du, sedimentu gainazaleko materia organikodun arrasto eta

detrituak bilatuz¹⁷. Hori dela eta, sedimentuko aldaketak antzeman eta ebaluatzeko baliatzen den espeziea da, metalek, zilar eta kobre oxidozko nanopartikulek, hidrokarburo aromatiko poliziklokoek, farmakoek, pH aldaketek eta gazitasunak eragindako kutsadura efektuak aztertzeko erabili delarik^{18,19}.

Metalek poliketoengan eragindako efektuen artean, hilkortasunaren emendioa, mugikortasun falta, galerietatik kanporatzeko joeraren handipena, zelomozitoen bideragarritasun murrizketa, kutsadura biomarkatzaileen (AChE –Azetil kolinesterasa-, GST –Glutation S-transferasa- eta LDH –Laktato deshidrogenasa-) jarduera areagotzea eta alterazio histopatologikoak behatu dira^{5,15,17}.

1.2.1. Ezaugarriak

Hediste diversicolor (jatorriz *Nereis diversicolor* izendatua) Annelida filum, Polychaeta klase, Phyllodocida ordena, Nereidae familia eta *Hediste* generoaren barruan sailkatzen da. Burua, gorputz-enbor segmentatu eta pigidioz osatutako animalia zilindriko eta luzangak dira. Enborrak segmentazio homonoma erakusten du eta segmentu bakoitzetik parapodio apendizet garatuak ateratzen dira^{20,21,22}. Gonokorikoak dira, gametoak zeloman heldu eta konduktu edo gorputzeko pareten apurketa bidez ingurura kanporatuz^{20,23}. Ugalketa tenperatura eta ilargi aldien arabera da, baina errutean aldakortasunak daude²⁴.

Bi irekidura edo gehiago dituzten U formako gordeleketan bizi dira, sedimentu-uraren arteko kontaktu azalera emendatu eta janari bilketa errazten baitute^{20,23}. *H. diversicolor* helduak lurraldekoiak dira eta gordelekuak defendatzen dituzte. Are gehiago, sedimentu berean bizi diren poliketoek elkar ekiditen dute; indibiduo ezberdinen galeriak sekula ere ez daude interkonektaturik²⁰.

1.2.2. Anatomia

Poliketoen gorputza tegumentuak inguratzen du, epidermisko epitelio zelulabakarrak jariatutako kutikula geruza meheak, alegia. Azpian, xafla basala eta ehun konektiboa aurkitzen dira, eta sakonago, bi muskulu mota (zirkularra eta zeharkakoa)^{23,25}. Muskulua peritoneoak estaltzen du, zelomaren barrunbea eta barne-organoak mugatuz²⁵. Digestio traktua, ahoan hasi eta uzkie amaitua, zelomaren erdialdean ageri da eta hiru atal ditu: aurrea, erdia eta atzea²¹. Erdi digestio traktua epitelio zelulabakarreko mukosak eratzen du eta egoeraren arabera, lauagoa edo gorabeheratsuagoa izan daiteke, inbaginazio eta tolesturek elikagaien xurgapen azalera emendatzen dutelarik^{21,25}. Digestio traktuaren erdi-atze partea kontsideratzen da sedimentuko metalen absortzio gune^{21,26}. Traktuaren muturretako bat mesenterio dortsalarekin konektatuta dago, zeina odol-hodi dortsalean bukatzen den. Kontrako aldean, mesenterio bentrala azaltzen da; haren amaieran, odol-hodi bentralaz gain, nerbio-kordoi bentrala ere antzeman daiteke (I. Eranskina)^{21,25}.

1.2.3. Zeloma

Anelidoek zirkulazioan dauden bi zeluladun konpartimentu dituzte. Odol sisteman hemozitoak daude eta zeloman zelomozito populazio ezberdinak, immunitate sistemaren defentsa gisa jokatzen dutenak²⁷. Immunitate zelulez gain, fluido zelomikoan heldu gabeko gametoak ere behatu dira²⁵.

Zelomozitoen arteko ezberdintasun estrukturalak haien funtzioarekin erlazionatuta daude batik bat²⁷. Amebozitoak dira immunitate zelula nagusi eta ugariak (granulozitoak), jarduera fagozitiko eta zitotoxikoak bideratzen dituztenak²⁸. Pikor zitoplasmaticoak dituzte (entzima hidrolitikoak beteriko lisosomak), baita filopodioak ere, higitu ahal izateko^{25,29}. Zelula mugikorren beste populazio ugaria

eleozitoena da; elikagai erreserbak (lipidoak eta glikogenoa) metatzen dituzte haien zitoplasman, baina beste hainbat funtzio ere deskribatu dira (pinozitosia, arnasketa, birsorkuntza, etab.)^{28,29}.

1.2.4. Estuarioaren gazitasun aldaketak

H. diversicolor poliketoek gazitasun aldakorreko inguruneetara moldatzeko gaitasuna daukate, gazitasun gorabeheratsuko eremuetan kokatu ohi direlarik²⁰. Dena den, ezin dira %10 baino gutxiagoko gazitasunetan ugaltu, larbak ezin baitira hain kontzentrazio baxuko medioan behar bezala garatu²⁰. Areago, ingurumeneko kutsatzaileek poliketoengan duten toxikotasuna gazitasun baldintzen pean dago. Gazitasun maila baxuek kobre metaketa eta toxikotasuna handitzen dute, absortzio tasarekin lotuta³⁰.

Lan honen xedea kobre metalaren kontzentrazio ezberdinek *Hediste diversicolor* espeziearen organismoko maila anitzean eragiten dituzten aldaketak ikertu eta gazitasunak kobreakin toxikotasunean duen efektua detaile handiagoz aztertzea izan dira, horretarako gazitasun desberdineko bi talde esperimental banatu direlarik (*Sea Water*, %30,6 eta *Brackish Water*, %20,7).

2. MATERIAL ETA METODOAK

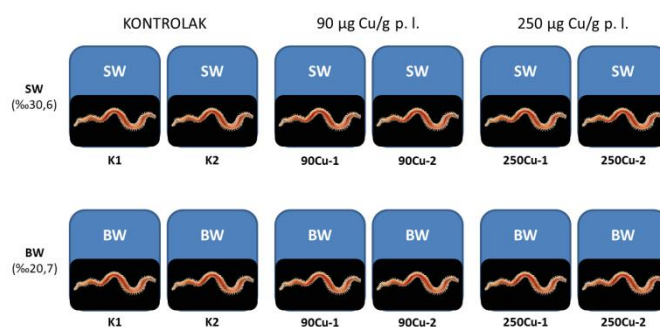
2.1. Sedimentuaren lorpena, tratamendua eta esperimentuaren muntaia

Sedimentua Butroe ibaiaren estuarioan batu zen, Plentzian (43°24'25.7"N 2°57'02.0"W koordinatuetan), itsasbeheran. Estuarioko lurzorua gainazaleko 10-15 cm-ko geruzatik jaso zen sedimentua³¹, 5-8 L bitarteko 11 ontzi betez. Ontzietako sedimentua plastikozko 5 kutxa handitan zabaldu eta airean lehortzen utzi zen hilabetez.

Behin sedimentua lehortuta, 4 mm-ko diametroan bahean zehar pasatu zen, partikula handienak (harriak, maskorrak, hostoak, zikinkeria, etab.) kentzeko. Modu honetan, sedimentu garbia eskuratu ondoren, 5 L-ko 12 ontzi 1 kg sedimentu lehorrekin bete ziren.

Bukatzeko, sedimentuak artifizialki kutsatu ziren, 3 kobre kontzentrazio ezberdinetan: kontrola, 90 µg Cu/g p. l. (pisu lehor) eta 250 µg Cu/g p. l.. Horretarako, sedimentuak kobredun disoluzioz (CuCl₂·2H₂O) heztu ziren, gazitasun ezberdineko urak erabilita (*Sea Water*, SW %30,6 gazitasuneko itsas ura eta *Brackish Water*, BW %20,7 gazitasuneko ur gazikara, itsas ur eta ur destilatu nahastea). Kontrolen kasuan, sedimentua SW eta BW ur garbiekin heztu zen.

Kobre disoluzioak gehitu eta gero, sedimentua kobreakin behar bezala nahas zedin, bi astez egonkortzen utzi zen³². Sedimentua egonkortuta, esperimentua baino egun bat lehenago, ontzi bakoitzean talde esperimentalari zegokion 3,75 L ur (SW edo BW) erantsi ziren (sedimentu geruza eta ur zutabea bereizi eta uraren uheretasuna desager zedin). Kobre kontzentrazio eta gazitasun baldintza bakoitzeko bi erreplika egin ziren (1. Irudia). Ontzi orotan aireztatzaileetara konektatutako difusoreak ipini ziren, uraren barneko airea birziklatu eta esperimentuan oxigeno kontzentrazioa %80tik gora konstante mantentzeko.



1. Irudia. Esperimentuko ontzien banaketa. Bi gazitasuneko taldeak (SW eta BW), kobre tratamendu ezberdinekin (K, 90Cu eta 250Cu).

2.2.Hediste diversicolor poliketoak

Esperimentuan baliaturiko poliketoak Micebo etxe komertzialetik lortu ziren, Galiziako (A Coruña) itsasadarretan eskuz hartuak. Dena den, esperimentua hasi aurretik, astebetez izan ziren aklimatatzen (Plentzian jasoriko sedimentu garbian). Tratamenduetako ontzi bakoitzean tamaina homogenea zuten 5 poliketo sartu ziren eta beste 10 poliketo baliatu ziren t_0 denborako datuak eskuratzeko; beraz, esperimentuaren lagin totala $n=70$ poliketotakoa izan zen.

2.3.Esperimentuaren garapena

HdCu %30,6 esperimentua abiatu zen egunean, stock-etik 40 poliketo jaso, 10 t_0 denbora gisa aztertzeke bereizi, eta beste 30ak 5eko taldeetan sailkatu ziren. Ontzietan jarri aurretik, 5 indibiduodun multzoen pisu hezea neurtu zen (talde guztien pisua antzekoa zela bermatuz).

t_0 denboratzat banandutako 5 poliketo indibidualki depuratzen utzi ziren 24 orduz, beirazko ontzietan eta itsasoko ur fluxupean (hurrengo egunean zelomaren erauzketa egin eta kaltzeinaren testa aplikatzeko), beste 5ak disezcionatu eta histologiarako erabili ziren bitartean (II. Eranskina).

Esperimentuak astebete iraun zuen, eta erdian, zunda bidez, uraren parametroak (pHa, temperatura, gazitasuna eta disolbaturiko oxigenoa) neurtu ziren. Amaieran, tankeetako ura sifoiekin kendu, ontzi bakoitzeko sedimentuaren lagin txikia eskuratu (beranduago analisi fisiko-kimikoak gauzatzeko) eta poliketoak bilatu, garbitu eta 5naka pisatu ziren. Lehen eta azken eguneko poliketo multzo berdinaren pisuak erkatuz, pisu galera aztertu zen. Hilkortasuna ere neurtu zen, ontzi bakoitzean hildako poliketo kopurua apuntatuz. Hildako poliketoak zegozkien taldearekin batera pisatu ziren. Azkenik, erreplikak elkar batu (K1 eta K2, 90Cu-1 eta 90Cu-2, 250Cu-1 eta 250Cu-2) eta baldintza bakoitzeko 10 poliketoak bi taldetan banatu ziren: 5 poliketo depuratzen utzi ziren 24 orduz (arestian aipaturiko kondizioetan, zeloma erauzteko asmoz) eta beste 5 poliketo diseziorako baliatu ziren (analisi histologikorako).

HdCu %20,7 esperimentua, ordea, HdCu %30,6 baino egun bat beranduago hasi zen. Dena den, berau aurrera eramateko prozedura HdCu %30,6 esperimentuarekin jarraitutakoaren berdina izan zen.

2.4.Zelomaren erauzketa eta zelomozitoen bideragarritasuna (kaltzeina testa)

Tratamendu bakoitzeko 5 poliketo 24 orduz depuratzen izan ostean (liseri-traktua garbitu eta sedimentu guztia kanporatzeko), haien zeloma erauzi zen. Horretarako, Petri plaka bakoitzean poliketo bana jarrita, erauzketa soluzioaren (%0,02 EDTA eta %1 antibiotikodun 0,17 M NaCl *Phosphate Buffered Saline solution*, PBS) 2 ml gehitu eta shock elektrikoa (9V) eragin zitzaien³³. Bada, zelomozitoak eta gametoak poliketoetatik ateratzen zirela ikusita, zeloma jaso (~2 ml) eta 40 μm -tako filtroan zehar igaroarazi zen, zentrifugatuz (500 rpm, 1 minutuz). Era honetara, gametoak (obozitoak eta esperma plakak) filtroan metatzen dira, zelomozitoak Falcon hodira pasatzen diren bitartean. Falcon hodian, amebozito eta gameto aske gutxi batzuk jalkinean gelditzen dira eta gain-jalkinean, aldiz, eleozitoak eta zenbait amebozito esekiduran. Hortaz, banaketa aproposa izan zela ziurtatzeko, laginak mikroskopioan behatu ziren. Alabaina, gain-jalkinean esperma plaka ugari mantendu zituzten laginetan, zentrifugazioa errepikatu zen.

Behin interesekeko zelula esekidura lortuta, hemozitometro (Neubauer ganbara) bidezko zelulen kontaketa burutu zen. Batetik, zenbaketak zelomozito kontzentrazioa ezagutzeko balio du eta bestetik, lagina adostutako $2 \cdot 10^5$ zelula/ml kontzentrazioa (3 ml-tan) eramateko egin beharreko diluzioaren berri emateko. Tratamendu guztietatik erdietsitako esekiduren kontzentrazioa berdintzeak, taldeen arteko kaltzeina testaren emaitzak konparagarriak izatea ahalbidetu zuen.

Ondoren, zelulen soluzioak 96 putzuko mikroplaketan erein ziren. Kobre tratamendu bakoitzeko zelulak bi zutabetan erein ziren, diluzio alderagarriaren ($2 \cdot 10^5$ zelula/ml) 100 μ l gehituz. Tratamendu bakoitzeko zutabeetako batean %0,1 Triton-X 100 μ l erantsi ziren (%0,05 esposizio kontzentrazio finala, 1 orduko esposizioa), eta 100 μ l 0,17 M NaCl PBS bestean. Azkenik, zutabe orotako lehen lau ilaratan 2,5 μ M-eko kontzentraziodun 2 μ l kaltzeina prestakina gehitu eta ilunpetan mantendu zen mikroplaka, 40 minutuz. Batetik, %0,05 Triton-X zuten zutabeak kontrol positibotzat hartu ziren; detergenteak zelulen mintzak solubilizatzen ditu, lisia eraginez; beraz, putzuetan kaltzeina egon arren, ez da fluoreszentsziarik behatzen. Bestetik, kaltzeina gabeko putzuek zelula soluzioaren *background* seinalea kentzeko balio izan zuten, eleozitoek berezko fluoreszentszia igortzen baitute (nahiz eta seinalea murrizta izan).

Triton-X eta kaltzeinaren esposizio denbora pasata, mikroplakako putzuen fluoreszentszia neurtu zen, Cytation 3 Cell Imaging multi-mode reader instrumentua (BioTek Inc., Winooski, AEB) eta Gen5 Image softwarea baliatuta. Kaltzeinaren fluoreszentszia detektatzeko kitzikapen uhin luzera 490 nm-tan eta igorpen uhin luzera 520 nm-tan neurtu ziren. Tratamenduen kaltzeinadun zutabeen fluoreszentszia %0,05 Triton-X putzuenarekin alderatuz, zelomozitoen bideragarritasuna aztertu zen.

Hain zuzen, zelomozitoen bideragarritasuna determinatzeko aplikatutako datuen trataerari dagokionez, tratamendu bakoitzeko kaltzeinadun putzuen fluoreszentszia balioei kaltzeina gabekoen fluoreszentszia balioak kendu zitzairen. Jarraian, baldintza bakoitzeko Triton-X gabeko putzuak zegozkien gazitasunaren kontrolarekiko ehunekotan adierazi ziren. Amaitzeko, %0,05 Triton-X putzuetako fluoreszentszia tratamendu bereko Triton-X gabeko putzuekiko ehunekotan neurtu zen. Analisi estatistikorako, kobre tratamendu ezberdinen putzuetako datuak gazitasun bereko kontrolarekin erkatu ziren, baita tratamendu bereko %0,05 Triton-X-dun putzuak Triton-X gabeko putzuen datuekiko ere.

2.5.Obozitoen zenbaketa, fixaketa eta diametroaren neurketa

Zelomaren erauzketa egin eta zentrifugatu ondoren, 40 μ m-tako filtroan atxikita gelditu ziren poliketoen gameto gehienak (obozitoak bereziki, baita esperma plakarik handienak ere). Filtroan metatutako materiala 5 mL 0,17 M NaCl PBS-tan berreseki zen, jarraian, obozitoak zenbatu eta kontzentrazioaren arabera, tratamendu guztietako laginak balio berera diluituz (1000 obozito/mL). Obozitoen kontaketarako, 5 mL disoluzioaren 50 μ L hartu eta tanta horretan zeuden obozito kopurua ezagututa, disoluzio beraren 1 mL-tan egongo litzatekeen obozito zenbakia kalkulatu zen. Bukatzeko, 1000 obozito/mL-ko kontzentraziodun bialak edukita, 3 tanta formaldehido bota zen bakoitzera (obozitoak fixatzeko) eta 4°C-ko tenperaturan gorde ziren obozitoen tamainaren neurketa burutu zen egunera arte. Fixatutako obozitoen tamaina (diametroa) alderantzizko mikroskopioan neurtu zen, NIS-Elements softwarea erabiliz. Talde esperimental bakoitzeko 100 obozitoen diametroak neurtu ziren, gero batez bestekoa egin eta desberdintasunak antzemateko.

2.6. Disekzioa, prestaketa histologikoa eta irudien analisisa

Esperimentua amaitu zen egunean, tratamendu bakoitzeko beste 5 poliketoak disekzionatu ziren (baita esperimentu hasieran t_0 denborako 5 poliketo ere). Disekzioan, poliketoen erdi aldeko xerra fina (0,5-1 cm) moztu zen analisi histologikorako, eta kasete batean sartu ostean, formalinan (%10 formaldehido PBS indargetzailean) murgildu eta 4°C-tan gorde zen 24 orduz. Denbora hau pasata, %70eko etanoletan sartu ziren, parafinan inkluitu arte bertan mantenduz.

Behin laginak fixatuta, deshidratatu eta parafinan inkluitu ziren ohiko protokoloa jarraituz (III. Eranskina). Laginen orientazioa kontuan eduki zen, bertikalki kokatu zirelarik poliketoen anatomiaren zeharkako mozketak eskuratzeko asmoz. Azkenik, parafinazko blokeak mikrotomoan moztu ziren, 5 µm-ko ebakiak lortuz (poliketo bakoitzeko bizpahiru xafla) eta kristalezko portetan itsatsiz.

Poliketoen ebakiak Hematoxilina-Eosinaz tindatu ziren, Leica Autostainer XL (Leica, Alemania) makina erabiliz eta IV. Eranskineko protokolo automatizatua jarraituz. Tindatutako laginak Nikon Eclipse TI-S (Nikon Corporation, Tokio, Japonia) mikroskopio optikoan behatu ziren, handipen ezberdinetan (x4, x10 eta x20). Argazkiak egin eta eskala ezartzeko, NIS-Elements F32 programa baliatu zen.

Hematoxilina-Eosinaz tindaturiko laginetan aldaketa histopatologikoak (nerbio ehuna, odol-hodiak, etab.) aztertzeaz gain, tratamendu ezberdinetako poliketoen digestio traktuaren altuera eta irregulartasuna analizatu zen ImageJ (v1.46, NIH, AEB) softwarearen bitartez. Batetik, digestio traktuaren altuerak kalkulatzeko, poliketoen traktuaren kanpo eta barne profilak irudikatu eta haien azalerak kalkulatu ziren. Ondoren, azalera oinarritutako erradioen arteko kenketa egin zen. Bestetik, irregulartasunak (biloska eta tolesturak) perimetroan oinarritutako barne erradio hipotetiko eta azalera oinarritutako barne erradio hipotetikoaren arteko zatiduraz kalkulatu ziren.

Esperimentuaren garapena planteatu zenean, proiektuaren beste xedeetako bat autometalografia saioa burutzea izan zen (kobrea *H. diversicolor* poliketoaren baitan zein organo/gunetan metatzen den aztertu ahal izatea, alegia). Covid-19 pandemiak eragindako egoera dela eta, ordea, atal esperimental hori aurrera eramatea ezinezkoa suertatu zen.

2.7. Analisi estatistikoak

Datuak aztertu eta analisi estatistikoak gauzatzeko Excel (Microsoft Office) eta SPSS (v26) programak erabili ziren. Datuen normaltasuna (Shapiro-Wilk proba) eta bariantzen homogeneotasuna aztertu eta gero, emaitzen esangarritasun estatistikoa errore barren eta faktore bakarrerako ANOVA (datu normal eta bariantza homogeneodunen kasuan, *post hoc* analisi modura Duncan testa aplikatuz) edo Kruskal-Wallis testaren (distribuzio ez-normal eta bariantza ez-homogeneoduneko datuetan) bidez determinatu zen, 0,05 baino txikiagoak ziren p balioak onartuz.

3. EMAITZAK

3.1. Poliketoen hilkortasuna eta pisu galera

Hilkortasunari dagokionez, SW %30,6 taldeko poliketoen hilkortasuna progresiboki emendatu zen kobre kontzentrazioa handitu ahala; kontroletan hilkortasunik ikusi ez zen artean, 90Cu tratamenduan

poliketoen %10a hil zen eta 250Cu tratamenduan, ostera, %30 (1. Taula). Aitzitik, BW %20,7 taldean, kontroletan behatu zen hilkortasun portzentaje handiena (%40). 90Cu tratamenduan ez zen hilkortasunik ikusi eta 250Cu tratamenduan, berriz, %20.

1. Taula. Poliketoen hilkortasuna. SW eta BW gazitasun taldeetako tratamendu bakoitzeko poliketoen hilkortasunaren (%) batez bestekoa eta desbiderapen estandarra.

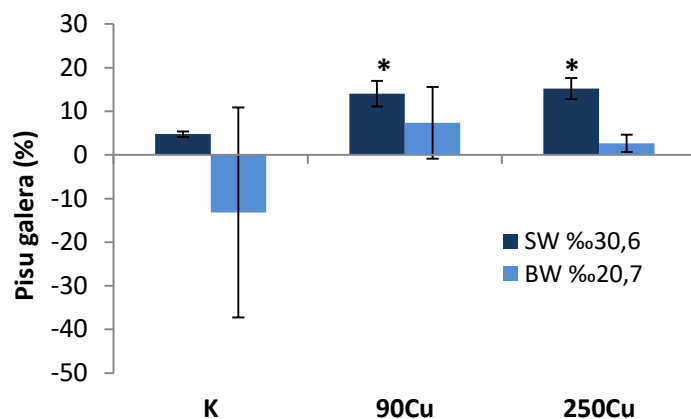
SW %30,6			BW %20,7		
K	90Cu	250Cu	K	90Cu	250Cu
0	10±14,14	30±14,14	40±0	0	20±28,28

Oro har, gazitasun ezberdinetako kobre tratamendu bakoitzeko poliketoen pisu galera ere behatu zen.

Hala ere, pisuaren gutxitzea ez zen proportzionala izan bi talde esperimentaletan, eta kasuren batean, pisu irabazia ere behatu zen (2. Irudia).

SW %30,6 taldeko poliketoetan, tratamendu batetik bestera, kobre kontzentrazioa handitu ahala, jazotako pisu galera nabarmenagoa izan zen. Kobre tratamenduak kontrolarekiko konparatzean, pisu galeraren batez bestekoaren artean aldakortasun esangarriak aurkitu ziren.

BW %20,7 taldeko poliketoetan, aldiz, gertaera ezberdinak aztertu ziren tratamendu bakoitzean. Alegia, kontrolen pisu galeraren ehunekoak balio negatiboa (%-13,2) edukitzeak, pisu irabazia egon zela eman zuen aditzera. Gainera, 90Cu eta 250Cu tratamenduetan pisu galera aztertu zen arren, ez zen SW tratamendu berdinaren taldeetan ikusitakoa bezain adierazgarria izan.

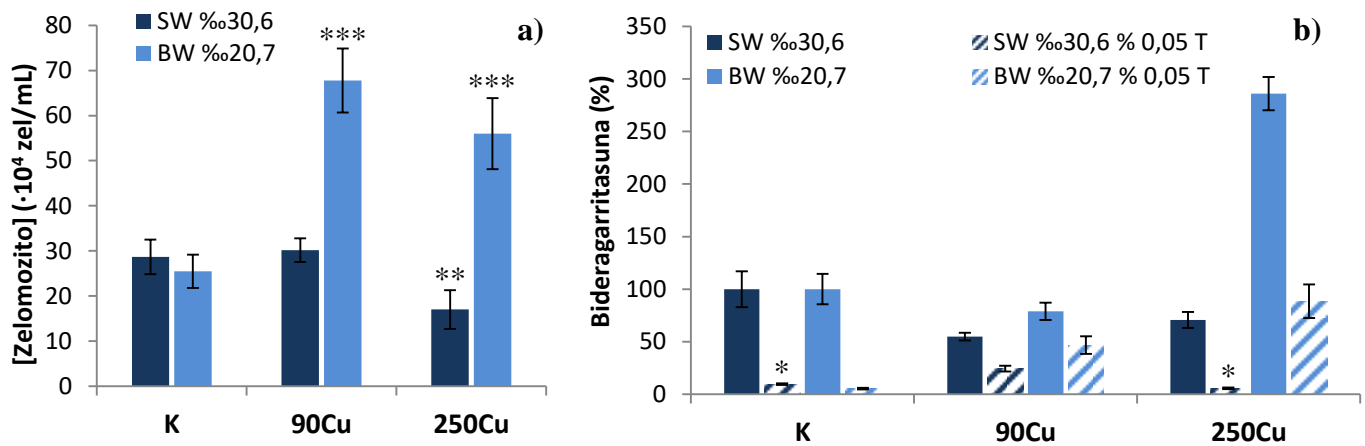


2. Irudia. Poliketoen pisu galera. SW eta BW gazitasun taldeetako tratamendu bakoitzeko (K, 90Cu, 250Cu) poliketoen pisu galeraren batez bestekoak eta desbiderapen estandarrak. Izartxoek (*) SW taldeko kobre tratamendu ezberdinen arteko aldakortasunak gazitasun bereko kontrolarekiko estatistikoki esangarriak direla adierazten dute (* $p < 0,05$).

3.2. Zelomozitoen bideragarritasuna (kaltzeina testa)

Alde batetik, bideragarritasuna zehazteko eginiko lehenengo kaltzeina testa t_0 denboran harturiko poliketoen zelomozitoekin gauzatu zen. Poliketoetatik erauzitako jatorrizko zelomozito kontzentrazioa $6 \cdot 10^5$ zelula/mL izan zen. Ajustatutako zelula disoluzioaren fluoreszentiari erreparatuz, %0,05 Triton-X-rekin trataturiko zelomozitoen bideragarritasuna %11,27ra murriztu zen (V. Eranskina).

Bestalde, t_7 denborako poliketoetatik erauzitako zelula kontzentrazioei dagokionez (3. a. Irudia), SW gazitasun taldean, kontrol eta 90Cu tratamenduetako poliketoetatik pareko zelomozitoen kontzentrazioa lortu zen ($2,87 \cdot 10^5$ eta $3,02 \cdot 10^5$ zel/mL, hurrenez hurren). Haatik, 250Cu poliketoetatik zelomozito kontzentrazio baxuagoa eskuratu zen ($1,7 \cdot 10^5$ ze/mL), aldakortasuna SW kontrolarekiko estatistikoki esangarria izanik ($p < 0,01$ mailan). BW gazitasun taldean, kobre kontzentrazioa emendatu ahala, zelomozito kontzentrazioak ere gora egin zuen. Kontrolako animaliekin $2,55 \cdot 10^5$ zelula/mL lortu ziren artean, 90Cu eta 250Cu taldeetan $6,77 \cdot 10^5$ eta $5,6 \cdot 10^5$ zelula/mL-ko soluzioak erdietsi ziren. Bi tratamenduak BW kontrolarekiko konparatuz, taldeen arteko aldakortasun esangarriak zeudela determinatu zen ($p < 0,001$ mailan).



3. Irudia. t₇ denbora. a) Zelomozito kontzentrazioa. Poliketoetatik erazitako zelomozito soluzioen jatorrizko kontzentrazioen (zel/mL) batez bestekoa eta desbiderapen estandarra (hemozitometroko lau karratuetako balioak aintzat hartuz). Izartxoek (*) SW eta BW tratamenduen arteko aldakortasunak estatistikoki esangarriak direla adierazten dute, kontrolekiko alderatuz (** p < 0,01; *** p < 0,001). **b) Zelomozitoen bideragarritasuna.** SW eta BW taldeen tratamendu bakoitzeko (K, 90Cu, 250Cu) ajustatutako zelula kontzentraziodun (2·10⁵ zelula/mL) soluzioen zelomozitoen bideragarritasunaren batez bestekoa eta desbiderapen estandarra. PBS-rekin inkubatutako zelomozitoak %100 gisa kontsideratu ziren, %0,05 Triton-X-rekin (%0,05 T) inkubatutako bidez neurtu zelarik bideragarritasun portzentajea. Izartxoek (*) %0,05 Triton-X putzuen aldakortasunak tratamenduko bereko Triton-X gabeko putzuekiko estatistikoki esangarriak direla adierazten dute (* p < 0,05).

Areago, t₇ denborako zelomozitoen bideragarritasuna aztertuz (3. b. Irudia eta VI. Eranskina), SW %30,6 taldeko zelomozitoetan, bideragarritasunaren beherakada handiena Triton-X gabeko kontrol eta 90Cu artean ikusi zen (%100tik %54,86ra), 250Cu tratamenduaren murrizketa ez baitzen hain nabarmena izan (%70,72). Alabaina, tratamendu ezberdinen artean behatutako aldakortasunak ez ziren estatistikoki esangarriak izan. Tratamendu bereko Triton-X gabeko eta %0,05 Triton-X-dun emaitzak erkatuz, kontrol eta 250Cu taldeen aldakortasunak esangarriak izan ziren (p < 0,05).

BW %20,7 taldeko zelomozitoetan, kontrol eta 90Cu tratamenduetan bideragarritasuna antzeko mantendu zen arren (%100 eta %78,95, hurrenez hurren), Triton-X gabeko 250Cu tratamenduko zelomozitoek erakutsi zuten bideragarritasunik handiena (%285,96, kontroleko zelomozitoena baino altuagoa, alegia). Halere, SW gazitasun taldearen kasuan bezala, tratamenduen arteko aldakortasunak ez ziren estatistikoki esangarriak izan. Tratamenduko bereko Triton-X gabeko eta %0,05 Triton-X-dun putzuen arteko ezberdintasunek ere ez zuten esangarritasun estatistikorik adierazi.

3.3. Obozitoen diametroa

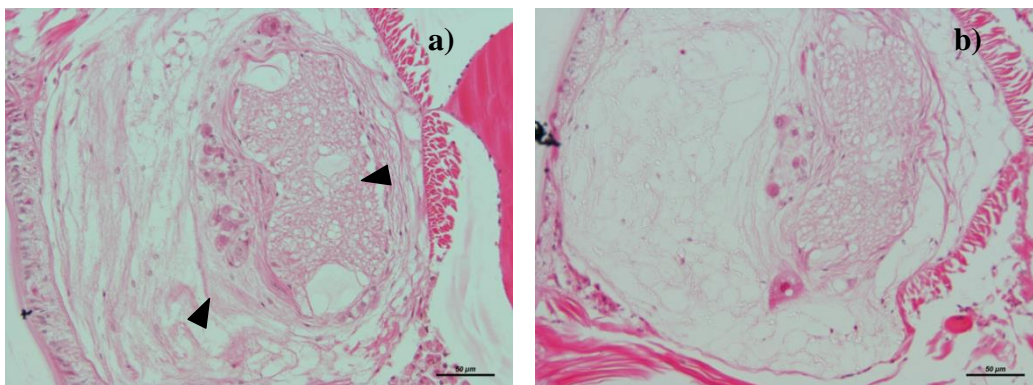
Orokorrean, lortutako obozitoen tamaina 90-175 μm bitartekoa izan zen. Dena den, gazitasun ezberdineko SW eta BW taldeak elkar konparatuta, oro har, %30,6ko gazitasunean inkubatutako poliketoen obozitoen diametroa handiagoa izan zen. Hala ere, gazitasun ezberdineko taldeen arteko aldakortasun horiek ez ziren estatistikoki esangarriak izan.

Bestalde, obozitoen tamaina eta kobre kontzentrazioaren arteko korrelazio argirik ez zen behatu. SW t₀, t₇-K, t₇-90Cu eta t₇-250Cu taldeetako poliketoen obozitoen diametroa 135,61; 175,96; 96,73 eta 162,83 μm-takoa izan zen hurrenez hurren, eta BW talde esperimentaletako poliketoen obozitoena, ordea, 155,51; 116,65; 90,71 eta 130,25 μm-takoa (VII. eta VIII. Eranskinak).

3.4. Hematoxilina-Eosina tindaketa

3.4.1. Azterketa histopatologikoa

Hematoxilina-Eosinaz tindaturiko laginetan ez zen aparteko alterazio patologikorik edo behatu, ezta parasitoen presentziarik ere. Dena den, 250Cu poliketoetan odol-hodien dentsitate altuagoa eta nerbio ehunaren aldakortasunak erreparatu ziren (IX. Eranskina). 4. Irudian SW gazitasuneko 90Cu eta 250Cu tratamenduetako poliketoen nerbio sistemak ikus daitezke.

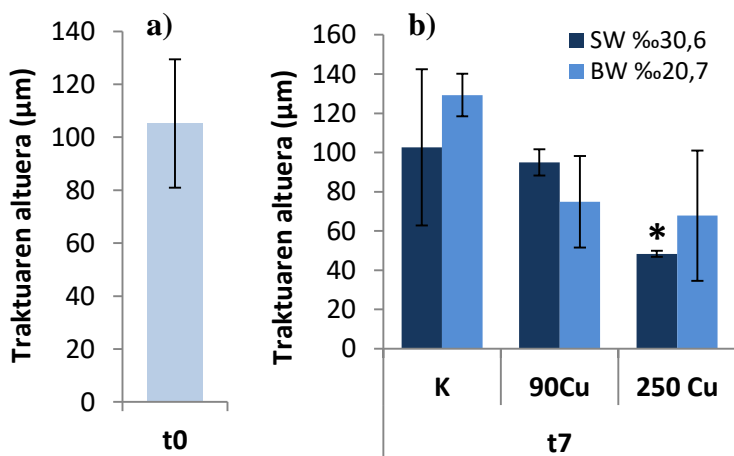


4. Irudia. SW gazitasuneko t₇ poliketoen nerbio sistema. a) 90Cu tratamenduan mantendutako eta b) 250Cu tratamenduan mantendutako poliketoena. 90Cu poliketoaren nerbio sistema antolatua eta trinkoago azaltzen da eta nerbio-kordioa inguratzen duen zuntz-babesa osoago dago (triangelu beltzak). Eskala-marra = 50 µm.

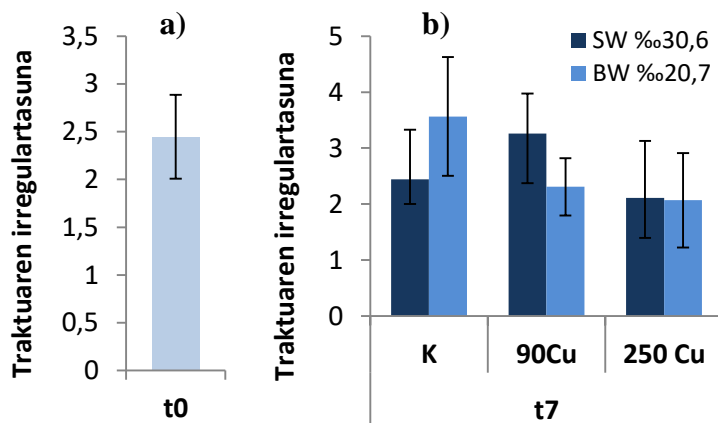
3.4.2. Digestio traktuaren altuera eta irregulartasuna

Digestio traktuaren altuerari dagokionez, SW gazitasun taldeko tratamenduen artean, kobre kontzentrazioa emendatu ahala, traktuaren altuerak tendentzia beherakorra erakutsi zuen. Hain zuzen ere, 250Cu eta t₀ denboraren arteko aldakortasunak estatistikoki esangarriak izan ziren (p < 0,05). Halaber, BW gazitasuneko taldean, oro har, digestio traktuak bere altuera murrizteko joera erakutsi zuen, sedimentuko kobre kontzentrazioa handitzen zen heinean (5. a. eta b. Irudia eta IX. Eranskina).

Digestio traktuaren irregulartasunei erreparatu ere antzeko tendentzia hauteman zen. Hots, SW taldeko 250Cu tratamenduko poliketoen liseri traktua ez zen hain gorabeheratsua izan; aitzitik, 90Cu poliketoen irregulartasunak kontrol eta t₀ denborako poliketoenak baino handiagoak izan ziren. BW gazitasunean, aldiz, kobre kontzentrazioak gora egin ahala, irregulartasunean joera beherakorra behatu zen (6. a. eta b. Irudia).



5. Irudia. Hematoxilina-Eosinaz tindatutako laginetan behaturiko poliketoen digestio traktuaren altueraren (µm) batez bestekoak eta desbiderapen estandarrak. a) t₀ denborako eta b) t₇ denborako tratamenduetako (K, 90Cu eta 250Cu) poliketoak. Izartxoak (*) SW 250Cu tratamenduko ezberdintasunak t₀ denborarekiko estatistikoki adierazgarriak direla adierazten du (* p < 0,05).



6. Irudia. Hematoxilina-Eosinaz tindatutako laginetan behaturiko poliketoen digestio traktuaren irregulartasunaren batez bestekoak eta desbiderapen estandarrak. a) t₀ denborako eta b) t₇ denborako (K, 90Cu eta 250Cu tratamenduetako) poliketoak.

4. EZTABAIDA

Lan honetan, *Hediste diversicolor* espeziearengan kobre kutsadurak eta gazitasun baldintza ezberdinek duten efektua ikertu da. Era berean, poliketo hau metalekin kutsaturiko sedimentuaren egoeraren berri emateko organismo adierazlea dela egiaztatu nahi izan da.

Kobrea bizitzarako ezinbesteko oligoelementua da (funtzio zelularra bermatu eta entzimen kofaktore gisa jarduten duena), baina maila jakinetik gora, oso toxikoa izan daiteke ornogabe urtarretan, proteinen desnaturalizazioa eta estres oxidatiboa sustatuz^{4,5,34}.

Esperimenturako hautaturiko kobre kontzentrazioak orokorrean ingurumen naturalean aurki daitezkeenak baino altuagoak izan arren, toxikotasunari dagokionez adierazgarriak izan litezke; alegia, metal honen eragin toxikoaren atalasea 86 µg Cu/g p. l. da eta efektu bortitz eta larriak 110 µg Cu/g p. l.-tik aurrera nabari daitezke (atalase horiek lan honetan erabilitako mailen inguruan azaltzen direlarik)³⁵. Sedimentua artifizialki kutsatzeko, mendi-koniferoen tratamendurako baliatzen den Cu₂O erabili beharrean^{10,11}, CuCl₂ erabili zen. Izan ere, alde batetik, beste saio batzuetan kobreak erredutzat hartu da eta bestetik, oxido gisa, kobreak solugarritasuna uretan oso baxua da, nahiz eta pH azidoagotan solugarritasuna handitu. Itsaso eta ozeanoek puntualki jasaten dituzten pH jaitsierak direla eta, denboran zehar sedimentuko kobre eskuragarritasuna emenda daiteke, gure diseinua baldintza naturaletara nolabait hurbiltzen delarik^{36,37}.

Esperimentuaren diseinua *Thain and Bifield*-ek (2001) proposatutakoaren moldaketa izan zen³⁸. Bio-entseguaren erdian neurturiko uraren parametroei dagokionez, aipatzekoa da uraren gazitasuna (SW %30,6 eta BW %20,7) %8-5 artean igo zela. Bada, Plentziako itsasadarretik jasotako sedimentua lehortzen utzi ondoren, urak zeukan NaCl sedimentuan metatu zen. Gainontzeko faktore fisiko-kimikoak, ostera, intereseko balioetan mantendu ziren (VIII. Eranskina).

Gazitasun eta kobre kontzentrazio ezberdin pean 7 egunez mantendutako poliketoek erantzun ezberdinak erakutsi zituzten organismo mailan. SW gazitasun taldeko poliketoen hilkortasuna kobre kontzentrazioarekin batera emendatu zen. Honek, itsas uretako gazitasun baldintzetan sedimentuan aurkitzen den kobreak bertan bizi diren poliketoen funtzio fisiologiko gakoak eragozten dituela iradokitzen du, haien biziraupena mugatuz^{17,39}. Lan honetan poliketoen heriotzaren arrazoi zehatza ikertu ez zen arren, kobreak presentziak tegumentua, zaurien sendaketa prozesua eta morfologia eraldatzen dituela deskribatu izan da literaturan, animaliek kalteetatik suspertzeko duten gaitasuna murriztuz³⁹. Honi erlazionaturik, SW taldeko poliketoen pisu-galera ere kobre kontzentrazioa igo ahala handitu zen, 90Cu eta 250Cu tratamenduek kontrolarekiko erakutsi zituzten aldakortasunak estatistikoki esangarriak izan zirelarik. Esposizio osteko elikatze-tasen kuantifikazioz, kutsatutako sedimentuan inkubaturiko organismoen energia harreraren gutxitzea ikusi da, horrek pisu galera azal dezakeelarik¹⁷. Are gehiago, kobre pean mantendutako organismoetan bidezidor anaerobikoen erabileraren emendioa ere behatu da, zeinak ATP ekoizpen efizientzia baxuagoa duen bidezidor aerobikoarekiko alderatuz. Hala bada, gertaera hauek poliketoen erreserba energetikoa murrizten dute, oro har, egokitzapen biologikoa eragotziz¹⁷.

BW gazitasun taldeari dagokionez, kontrolean hazitako poliketoen hilkortasuna %40koa izan zen; kontrolen hilkortasuna %10 baino handiagoa denean bioentseguak ezin onar daitekeenez, BW talde

esperimentalean eskuratutako emaitzen fidagarritasuna ezin izan zen bermatu. Kontroletan behatu zen hilkortasun altua azaltzeko bi hipotesi proposatzen dira. Alde batetik, *stock*-etik hartutako poliketoen egoera eskasa zela eta bestetik, *H. diversicolor* espezieko indibiduoek gazitasun tarte zabalarekiko tolerantzia izan arren, estuario inguruneetako gazitasunetan aurkitzen direla erosoan, aktiboago egonik²⁰. Hori dela eta, baliteke %20,7 gazitasun mailan, 1 kg sedimentutan 5 animalia sartzea gehiegizko suertatu, banakoek elkar topo egin eta haien arteko kanibalismoa gertatu izana^{20,40}. Gainera, kontroletan ikusitako pisu-irabaziak azken teoria hau indartzen du. Nahiz eta beste ikerketa batzuetan gazitasun baxuek kobreaken metaketa eta toxikotasuna handitzen dutela baieztatu³⁰, egoera honetan, kobreak poliketoen aktibitatea murriztu ahal izan du, bere efektu toxikoa nolabait estali eta halaber, indibiduen arteko lehia gutxituz. Are gehiago, kontuan hartu behar da behaturiko hilkortasunaren desbiderapen estandarrak altuak izan zirela; izan ere, tratamendu bakoitzaren erreplika kopurua txikia izan zen (2 besterik ez), baita erreplika bakoitzeko poliketo kopurua (5) ere. Entsegurako baliatutako laginaren tamaina txikiegia izan zen eta hori dela eta, hilkortasun emaitzen fidagarritasuna bermatzeko, funtsezkoa litzateke lagin tamaina handitzea (erreplika zein poliketo kopurua).

Organismo mailan (hilkortasuna eta pisu galera) behatutako efektuak maila zelularrean modu goiztiarrean antzeman daitezkeenez, *H. diversicolor* zelomozitoekin eginiko entseguak sedimentuen kutsadura ikertzeko erabilgarriak izan daitezke. Lehendabizi, t_0 denborako poliketoen kaltzeina testa metodo esperimentalak prest jartzeko gauzatu zen. Batetik, poliketoetatik zelula kopuru esangarria eskuratzea posible zela determinatu zen, tratamenduak elkarren artean konparatzeko kontzentrazio zehatza finkatuz, animaliarik kaltetu eta estresatuenetan ere, behetik jota $2 \cdot 10^5$ zelula/mL lortu ahalko liratekeela ezarri. Bestetik, zelomozitoak estresarekiko sentikorrak direla ziurtatzeko balio izan zuen; Trinton-X-ren pean, beste modelo zelularrek bezala funtzionatu zuten, mintzak puskatu eta heriotza zelularra jasoz. Azkenik, kaltzeina testa zelula hauen bideragarritasuna aztertzeko erantzunkorra dela frogatzeko erabili zen; hain zuzen, kaltzeina bizirik zeuden zelomozitoetan barneratu eta metatzen zela, fluoreszentzia igorri.

Kaltzeina testaren emaitzak interpretatzeko, aintzat izan behar da zelomozito mota ugari agertzen direla poliketoen zeloman, immunitate sistemaren zenbait prozesutan lanean dihardutenak. Immunitate zelula horien helburua, besteak beste, metal astunen detoxifikazioa ahalbidetzea da⁴¹. Dena den, *H. diversicolor* espezieak kobre eta beste metalekiko garatu duten tolerantzia azaltzeko beste hainbat mekanismo ere deskribatu dira, hala nola, digestio hodiko mukosaren produkzio handipena (metal absortzioa murriztuz), metal tranpen (MEPII metaloproteina, kasu) adierazpenaren emendioa, etab⁴¹.

SW gazitasun taldeko poliketoetatik erauzitako zelomozito kontzentrazioen aldakortasunak kobre kontzentrazio altueneko sedimentuan (250Cu) soilik izan ziren estatistikoki esangarriak; alegia, 250Cu tratamendutik zelomozito kontzentrazio baxuagoa erauzi zen, kontrolarekiko alderatuz immunodefizientzia jasan zutela adieraziz. Haatik, 90Cu tratamenduko poliketoetan kontrolaren antzeko zelomozito kontzentrazioa lortu zen. Alabaina, zelomozitoen bideragarritasunak tendentzia beherakorra erakutsi zuen kobredun bi tratamenduetan (90Cu eta 250Cu). Nahiz eta kobreaken presentziak, kontzentrazio baxuagoetan, zelomozito eskasia ez eragin, bideragarritasuna mugatzen du, metalak sustatzen dituen kalte fisiologikoen ondorioz seguruenik^{27,41}. Hala ere, immunitate sistemaren ahultzea eragin duten alterazio fisiologikoak aztertzeko, etorkizuneko beste lanetan poliketoen estres oxidatibo eta ROS mailak neurtu ahalko lirateke.

Bestalde, 90Cu tratamenduan %10eko hilkortasuna behatu izanak, bestelako tolerantzia mekanismoak zelomozitoek eratzten duten immunitate defentsa bezain eraginkorrak ez direla iradokitzen du.

BW gazitasun taldeko poliketoetatik erauzitako zelomozito kontzentrazioek aurkako joera izan zuten; hots, kobre kontzentrazioa emendatu ahala, lorturiko zelomozito kontzentrazioak ere gora egin zuen. Gainera, 90Cu zein 250Cu tratamenduen kasuan behaturiko zelomozito kontzentrazioaren handipena estatistikoki esangarria izan zen. Kontzentrazio bereizgarri hauek bat datoz BW taldean ikusitako hilkortasun eta pisu-galeraren balio arraroekin. *H. diversicolor* espeziea estuarioaren gazitasun bereko (itsasoko ur eta ur gezaren arteko nahastea) uretan aktiboago dagoela mantenduz²⁰, %20,7 gazitasuneko kontrol poliketoen jarduera maila handia da. Estres gabeko baldintzetan, berriz, aktibitate altuak ez du zertan eraginik izan zelomozitoen kontzentrazioan. Aitzitik, kobre esposizioa dela eta, baliteke metalak indibiduen energia kontsumoa eta metabolismoa murriztu izana¹⁷, aldi berean, defentsa zelulen aktibazioa areagotuz. Hain zuzen, BW gazitasun taldean, esperotakoaren kontran, kobreak ez du immunitate sistema indargetzen (esposizio laburraren ostean, behintzat), haren bizkortzea sustatzen baizik. Kaltzeina testaren emaitzek hipotesi hau berresten dute; izan ere, kobre kontzentrazio oso altuetara esposatutako poliketoetatik erauzitako zelomozitoen bideragarritasunak tendentzia gorakorra erakutsi zuen. Are gehiago, 90Cu tratamenduko zelomozitoen bideragarritasuna kontrolekoekiko parekoa izan zen arren, %0,05 Triton-X-arekin inkubatutako zelulek stres honekiko tolerantzia hobea azaldu zuten. Antzeko efektua behatu da kutsadura maila altuetan bizi diren poliketo batzuetan; metalekiko esposizio kronikoak nolabaiteko adaptazioa eragin du animalien, immunitate defentsaren eskasia gutxitu eta kutsadurarekiko tolerantzia handituz⁴¹. Hala eta guztiz ere, lan honetan eginiko esperimentua 7 eguneko izanik, ez dirudi aipatutako adaptazioak sortzeko denbora nahikoa egon denik eta beraz, etorkizunean sakonago aztertu beharreko prozesua litzateke.

Talde esperimental orotan inkubatutako poliketoen obozitoen batez besteko diametroa antzekoa izan zen, 90-175 µm bitartekoa. Gainera, neurturiko obozitoak tratamendu ezberdin bakoitzeko 5 poliketoren *pool*-ekoak izateak azaltzen ditu eskuratu ziren desbiderapen estandar balio altuak. Hortaz, tamainaren neurketatik eta obozitoen azterketa mikroskopikotik ondorioztatu zenez, kobreak ez zuen efektu deigarririk eduki animalien ziklo oogenikoan, ezta gametoen garapen prozesuan ere. Areago, urteko sasoi gehienetan zehar, poliketo indibiduo ezberdinen obozitoen tamainan aldakortasunak behatzea ohikoa da, batez ere ziklo oogenikoaren hazkuntza azkarraren fasean⁴². Beraz, obozitoen 90-175 µm arteko tamaina ziklo oogenikoaren hazkuntza estadioari lotuta dagoela determinatu^{24,42} zen eta hala, erabilitako poliketo guztiek pareko heldutasun maila zutela baieztatu.

Printzipioz, esperimentuak irauin zuen 7 egunetan, kobre esposiziotik espero zitekeen bakarra efektu toxiko akutua gertatzea zen, obozitoen berehalako heriotza eraginez³⁹. Haatik, obozitoen tamainaren neurketa eta azterketa mikroskopikotik deduzitutakoaren arabera, kobreak ez zuen eraginik eduki ziklo oogenikoan. Nolanahi ere, litekeena da ziklo oogenikoaren hasierako faseetan kobre pean eginiko esposizio-aldi luzeagoak, metal honek oogenesisian dituen ondorio adierazgarriak baieztatzea³⁹.

Halaber, poliketoen gainerako organoetan ez zen alterazio histopatologiko esangarririk topatu Hematoxilina-Eosinaz tindaturiko laginak aztertzerakoan. Berezitasunen artean, 250Cu tratamenduko

indibiduen nerbio-sistemaren trinkotasuna eta antolaketa 90Cu tratamendukoena baino eskasagoa zela ikusi zen, kobre kontzentrazio oso altuek neurotoxikotasuna eragin dezaketela iradokiz. Hala ere, kobreak nerbio ehunean eduki ditzakeen efektu konkrituak aztertzeko, etorkizunean beste neurketa batzuk egin daitezke, azetilkolinesterasaren (AChE) aktibitatearena, esaterako. Azetilkolinesterasa entzima ezinbestekoa da nerbio kinaden transmisio aproposa ahalbidezko, azetilkolina neurotransmisorearen apurketa katalizatzen baitu pitzadura sinaptikoan⁴³. Bere inhibizioak erabilera zabala du fosfato organiko eta karmabato pestiziden biomarkatzaile espezifiko gisa eta *H. diversicolor* espeziearekin buruturiko azken ikerketek adierazi dutenez, sedimentuan kobrea bezalako metal astunen presentzia detektatzeko sentikortasuna ere erakutsi du^{17,20,43,44}.

Bestetik, odol-hodien dentsitate altuagoa behatu zen 250Cu tratamenduko poliketoen digestio traktuaren inguruan. Haatik, digestio sistemara odol-fluxu handiagoa iristeak metalen detoxifikazioan eta metabolismoan eduki dezakeen eraginik deskribatu ez denez, posible da aldakortasun hau zoriz agertu izana eta kobre esposizioarekiko independentea izatea.

Azkenik, digestio traktuaren altuerari dagokionez, SW taldeko kontrolean eta 90Cu tratamenduan ez zen t_0 denborarekiko aldakortasunik aurkitu. Alabaina, t_0 poliketoekiko erkatuz, 250Cu poliketoen digestio traktuaren altueraren murrizpena estatistikoki esangarria izan zen. BW gazitasun taldean ere joera berbera erreparatu zen, nahiz eta ez hain modu nabarmenean (ezberdintasunak ez zirelako estatistikoki esangarriak izan); kobre kontzentrazioa emendatzearekin batera, altuera txikitu zen. Literaturan *H. diversicolor* espeziean parametro hau neurtu izanaren berririk aurkitu ez den arren, *Lumbricus terrestris* oligoketoan oinarritutako lanetatik abiatuz onar daiteke digestio epitelioaren altueraren aldaketa metalen aurrean identifikatutako efektu biologiko garrantzitsua dela, metal kantitate handiak kudeatu eta eliminatzeko modua izanik⁴⁵. Poliketoen elikadura mekanismo nagusia sedimentu partikulen ingestioa da, bertan metatutako konposatuak digestio sistemak absorbitzen dituelarik¹⁷.

Digestio traktuaren irregulartasunak ere antzeko tendentzia jarraitu zuen. Kobre kontzentrazioa handitu zen heinean, irregulartasunak behera egin zuen. Aitzitik, SW zein BW taldeen aldakortasunak ez ziren estatistikoki esangarriak izan, nahiz eta SW gazitasuneko poliketoek jasandako irregulartasun murrizketa agerikoagoa izan zen. Digestio traktuaren perfila irregularragoa izateak, sedimentuarekin duen kontaktu-azalera handiagoa dela ematen du aditzera, elikatzeko-ahalmena optimizatuz. Emaiza hauek traktuaren altueraren balioekin bat egiten dute; eskuarki, kontrol eta 90Cu tratamenduetako poliketoak egoera aproposagoan egon diren bitartean, 250Cu tratamenduko poliketoek estresa pairatu dute. Bada, estres horrek digestio epitelioa eraldatu du, kobre kontzentrazio altuari aurre egiteko kontaktu-azalera txikituz eta epitelioaren altuera murriztuz²³. Dena den, ehun-mailako aldaketak izanik, emaitza esangarriak aztertzeko lagin handiagoa eta esposizio luzeagoa beharko liriateke (kronikoki kutsatutako animalietan azterketa hauek errepikatzea interesgarria izanik).

Gainera, digestio funtzioak alteraziorik jasan duen determinatzeko, etorkizuneko lanetan beste bi parametro azter daitezke. Alde batetik, makromolekulen erreserbak neur daitezke, lipido, proteina eta karbohidratoen kuantifikazioa gauzatu eta zelulen energia kopurua (CEA, *cellular energy allocation*) zehaztuz^{17,23}. Izan ere, digestio traktua kaltetuta badago, elikagaien sarrera-efizientzia txikiagoa izango da eta beraz, energia erreserbak gutxituko dira, pisu-galera ere jazoz¹⁵. Bestetik, digestio entzimen (amilasa eta

karboximetilzelulasa) aktibitatea ere neur daiteke, *H. diversicolor* espeziearen nutrizio egoeraren erakusle apropos kontsideratzen baitira⁴⁴.

Azpimarratzekoa da lanaren beste helburuetako bat kobrearen bioakumulazioa eta banaketa azpi-zelularra ikertzea zela, baina Covid-19 pandemia egoerak ez duela baimendu. Aitzitik, kobrearen distribuzioa ulertzea funtsezkoa da barneratutako kobre partikulen toxikotasun mekanismoak eta detoxifikazio prozesua argitzeko⁴⁶.

5. ONDORIOAK

Laburbilduz, konplexutasun maila desberdinetan (organismo, ehun eta zelula mailak) neurturiko parametroen konbinaketak *H. diversicolor* poliketoak sedimentuen toxikotasuna aztertzeke espezie adierazle gisa duen erabilgarritasuna uzten du agerian, etorkizun batean estuarioetako sedimentuen kudeaketarako tresna modura balia daitekeelarik. Areago, lan honetatik kobre kontzentrazio altuek poliketoen prozesu fisiologiko eta immunitate funtzioan eragiten dutela ondorioztatu da, gazitasun baldintzek ere erantzun hauetan eragina izanik. Planteaturiko balizko hipotesiak benetakoak direla frogatzeko, etorkizunean esperimentera errepikatzea proposatzen da, esposizio denbora luzatuz eta beste parametro biokimiko eta histologiko batzuk ere aztertuz.

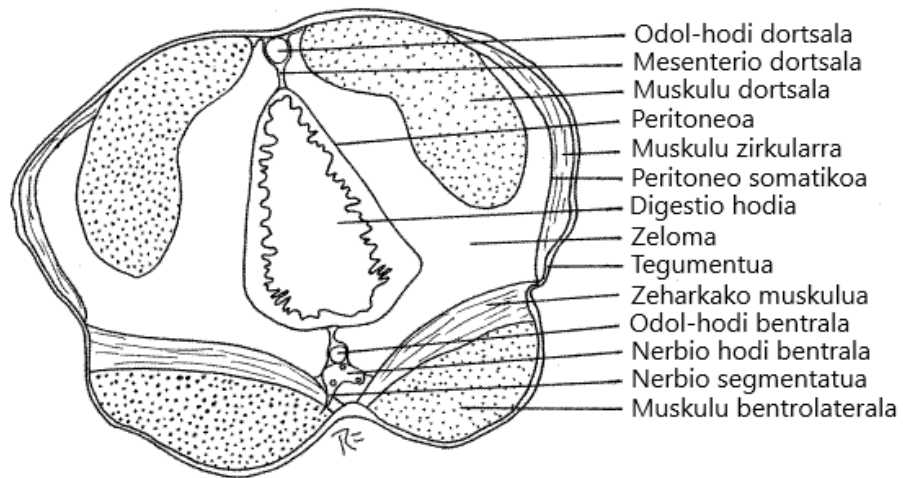
6. BIBLIOGRAFIA

1. Kennish, M. J. (2002). Environmental threats and environmental future of estuaries. *Environmental Conservation*, 29(1), 78-107.
2. Durou, C., Mouneyrac, C. & Amiard-Triquet, C. (2008). Environmental quality assessment in estuarine ecosystems: Use of biometric measurements and fecundity of the ragworm *Nereis diversicolor* (Polychaeta, Nereididae). *Water Research*, 42(8-9), 2157-2165.
3. Garcia Velasco, N., Urionabarrenetxea Gorroño, E., Soto López, M. & Zaldibar Aranburu, B. (2020). Sedimentuen toxikotasunaren azterketa integrala ekologikoki esangarriak diren espezieak erabiliz. *Ekaia, Ale Berezia*, 1-11.
4. Mucha, A. P., Vasconcelos, M. T. S. D. & Bordalo, A. A. (2004). Vertical distribution of the macrobenthic community and its relationships to trace metals and natural sediment characteristics in the lower Douro estuary, Portugal. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 59(4), 663-673.
5. Bat, L. (2005). A Review of Sediment Toxicity Bioassays Using the Amphipods and Polychaetes. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 5(2), 119-139.
6. Bryan, G. W. & Hummerstone, L. G. (1971). Adaptation of the polychaete *Nereis diversicolor* to estuarine sediments containing high concentrations of heavy metals. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 51, 845-863.
7. Bryan, G. W. (1971). The effects of heavy metals (other than mercury) on marine and estuarine organisms. *Proceedings of the Royal Society B*, 177, 389-410.
8. 2016/1179 Araudia (EU). Europar Batasuna. Europar Batasuneko Aldizkari Ofiziala, Bruselas. 2016ko uztailaren 19an. Hurrengo webgunetik berreskuratua, 2020ko urtarrilaren 24an: <https://www.boe.es/doi/2016/195/L00011-00025.pdf>
9. Barnes, I., Kirisits, T., Akulov, A., Chhetri, D. B., Wingfield, B. D., Bulgakov, T. & Wingfield, M. J. (2008). New host and country records of the *Dothistroma* needle blight pathogens from Europe and Asia. *Forest Pathology*, 38(3), 178-195.
10. Iraunkortasuna eta Ingurune Naturala Zaintzeko Saila, Bizkaiko Foru Aldundia. Bizkaiko Aldizkari Ofiziala, Bilbo. 2019ko martxoaren 26an.
11. 0263 LI/2019 Foru Agindua. Ekonomia Sustapeneko, Landa Ingurune eta Lurralde Oreka Departamentua, Gipuzkoako Foru Aldundia. Gipuzkoako Aldizkari Ofiziala, Donostia. 2019ko apirilaren 3an.
12. Habbache, N., Alane, N., Djerad, S. & Tifouti, L. (2009). Leaching of copper oxide with different acid solutions. *Chemical Engineering Journal*, 152(2-3), 503-508.
13. Riba López, I., Kalman, J., Vale, C. & Blasco, J. (2010). Influence of sediment acidification on the bioaccumulation of metals in *Ruditapes philippinarum*. *Environmental Science and Pollution Research*, 17(9), 1519-1528.
14. Freitas, R., Pires, A., Moreira, A., Wrona, F. J., Figueira, E. & Soares, A. M. (2016). Biochemical alterations induced in *Hediste diversicolor* under seawater acidification conditions. *Marine Environmental Research*, 117, 75-84.
15. Durou, C., Smith, B. D., Roméo, M., Rainbow, P. S., Mouneyrac, C., Moulound, M., G. ... Amiard-Triquet, C. (2007). From biomarkers to population responses in *Nereis diversicolor*: Assessment of stress in estuarine ecosystems. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 66, 402-411.
16. Fidalgo E Costa, P., Gil, J., Passos, A. M., Pereira, P., Melo, P., Batista, F. & Cancela Da Fonseca, L. (2006). The market features of imported non-indigenous polychaetes in Portugal and consequent ecological concerns. *Scientific Advances in Polychaete Research*, 70, 287-292.

17. Moreira, S. M., Lima, I., Ribeiro, R. & Guilhermino, L. (2006). Effects of estuarine sediment contamination on feeding and on key physiological functions of the polychaete *Hediste diversicolor*: Laboratory and in situ assays. *Aquatic Toxicology*, 78(2), 186-201.
18. Burlinson, F. C. & Lawrence, A. J. (2007). A comparison of acute and chronic toxicity test used to examine the temporal stability of a gradient in copper tolerance of *Hediste diversicolor* from the Fal estuary, Cornwall, UK. *Marine Pollution Bulletin*, 54(1), 66-71.
19. De Marchi, L., Neto, V., Pretti, C., Figueira, E., Chiellini, F., Soares, A. M. V. M. & Freitas, R. (2017). Physiological and biochemical responses of two keystone polychaete species: *Diopatra neapolitana* and *Hediste diversicolor* to Multi-walled carbon nanotubes. *Environmental Research*, 154, 126-138.
20. Scaps, P. (2002). A review of the biology, ecology and potential use of the common ragworm *Hediste diversicolor* (O. F. Müller) (Annelida: Polychaeta). *Hydrobiologia*, 470, 203-218.
21. Brusca, R. C. & Brusca, G. J. (2005). *Invertebrados*. Mc Graw-Hill, 2ª edición.
22. Pettibone, M. H. (1963). Marine polychaete worms of the New England region. *Bulletin of the United States National Museum*, 227, 1-356.
23. Romo Sancho, O. (2013). Sedimentuen ebaluazio toxikologikoa biomarkatzaile zelular eta tisularrak erabiliz *Nereis diversicolor* poliketoan. Master Amaierako Lana, Euskal Herriko Unibertsitatea, EHU/UPV (pp. 50).
24. Abrantes, A., Pinto, F. & Moreira, M. H. (1999). Ecology of the polychaete *Nereis diversicolor* in the Canal de Mira (Ria de Aveiro, Portugal): Population dynamics, production and oogenic cycle. *Acta Oecologica*, 20(4), 267-283.
25. Fox, R. (2007). *Nereis virens* Ragworm. Lander University, Greenwood, SC: *Invertebrate Anatomy OnLine*. Hurrengo webgunetik berreskuratua, 2020ko apirilaren 16an: <http://lanwebs.lander.edu/faculty/rsfox/invertebrates/nereis.html>
26. Thit, A., Dybowska, A., Købler, C., Kennaway, G. & Selck, H. (2015). Influence of copper oxide nanoparticle shape on bioaccumulation, cellular internalization and effects in the estuarine sediment-dwelling polychaete, *Nereis diversicolor*. *Marine Environmental Research*, 111, 89-98.
27. Cuvillier-Hot, V., Boidin-Wichlacz, C. & Tasiemski, A. (2014). Polychaetes as annelid models to study ecoimmunology of marine organisms. *Journal of Marine Science and Technology*, 22(1), 9-14.
28. Vetvicka, V. & Floyd, S. (2009). Origins and functions of annelid immune cells: the concise survey. *Invertebrate Survival Journal*, 6, 138-143.
29. Hartenstein, V. (2006). Blood Cells and Blood Cell Development in the Animal Kingdom. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 22, 677-712.
30. Ozoh, P. T. E. (1992). The effect of temperature and salinity on copper body-burden and copper toxicity to *Hediste (Nereis) diversicolor*. *Environmental Monitoring and Assessment*, 21, 11-17.
31. Cong, Y., Banta, G. T., Selck, H., Berhanu, D., Valsami-Jones, E. & Forbes, V. E. (2014). Toxicity and bioaccumulation of sediment-associated silver nanoparticles in the estuarine polychaete, *Nereis (Hediste) diversicolor*. *Aquatic Toxicology*, 156, 106-115.
32. King, C. K., Dowse, M. C., Simpson, S. L. & Jolley, D. F. (2004). An Assessment of Five Australian Polychaetes and Bivalves for Use in Whole-Sediment Toxicity Tests: Toxicity and Accumulation of Copper and Zinc from Water and Sediment. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 47, 314-323.
33. Irizar, A., Duarte, D., Guilhermino, L., Marigomez, I. & Soto, M. (2014). Optimization of NRU assay in primary cultures of *Eisenia fetida* for metal toxicity assessment. *Ecotoxicology*, 23, 1326-1335.
34. Bouraoui, Z., Ghedira, J. & Boussetta, H. (2015). Biomarkers responses in different body regions of the polychaete *Hediste diversicolor* (Nereidae, Polychaete) exposed to copper. *Journal of Integrated Coastal Zone Management*, 15(3), 371-376.
35. Allen Burton, G. (2002). Sediment quality criteria in use around the world. *Limnology*, 3(2), 65-75.
36. Millero, F. J., Woosley, R., DiTrollo, B. R. & Waters, J. (2009) Effects of the ocean acidification on the speciation of metals in seawater. *Oceanography*, 22(4), 72-85.
37. Leal, P. P., Hurd, C. L., Sander, S. G., Armstrong, E., Fernández, P. A., Suhrhof, T. J. & Roleda, M. Y. (2018). Copper pollution exacerbates the effects of ocean acidification and warming on kelp microscopic early life stages. *Scientific Reports*, 8(1).
38. Thain, J. & Bifield, S. (2001). Biological effects of contaminants: Sediment bioassay using the polychaete *Arenicola marina*. *ICES Techniques in Marine Environmental Sciences*, 29, 1-16.
39. Mettam, C., Santhanam, V. & Havard, M. S. C. (1982). The oogenic cycle of *Nereis diversicolor* under natural conditions. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 62(3), 637-645.
40. Batista, F. M., Fidalgo e Costa, P., Matias, D., Joaquin, S., Massapina, C., Passos, A. M. ... Cancela da Fonseca, L. (2003). Preliminary results on the growth and survival of the polychaete *Nereis diversicolor* (O. F. Müller, 1776), when fed with faeces from the carpet shell clam *Ruditapes decussatus* (L., 1758). *Boletín Instituto Español de Oceanografía*, 19(1-4), 443-446.
41. Watson, G. J., Pini, J., Leach, A. & Fones, G. (2013). Long-term incubation of adult *Nereis virens* (Annelida: Polychaeta) in copper-spiked sediment: The effects on adult mortality, gametogenesis, spawning and embryo development. *Aquatic Toxicology*, 128-129, 1-12.
42. Cuvillier-Hot, V., Gaudron, S. M., Massol, F., Boidin-Wichlacz, C., Pennel, T., Lesven, L. ... Tasiemski, A. (2018). Immune failure reveals vulnerability of populations exposed to pollution in the bioindicator species *Hediste diversicolor*. *Science of the Total Environment*, 613-614, 1527-1542.
43. Nunes, B. (2011). The Use of Cholinesterases in Ecotoxicology. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 212, 29-59.
44. Kalman, J., Palais, F., Amiard, J. C., Mouneyrac, C., Muntz, A., Blasco, J., ... Amiard-Triquet, C. (2009). Assessment of the health status of populations of the ragworm *Nereis diversicolor* using biomarkers at different levels of biological organisation. *Marine Ecology Progress Series*, 393, 55-67.
45. Amaral, A., Soto, M., Cunha, R., Marigomez, I. & Rodrigues, A. (2006). Bioavailability and cellular effects of metals on *Lumbricus terrestris* inhabiting volcanic soils. *Environmental Pollution*, 142, 103-108.
46. Thit, A., Banta, G. T. & Selck, H. (2015). Bioaccumulation, subcellular distribution and toxicity of sediment-associated copper in the ragworm *Nereis diversicolor*: The relative importance of aqueous copper, copper oxide nanoparticles and microparticles. *Environmental Pollution*, 202, 50-57.

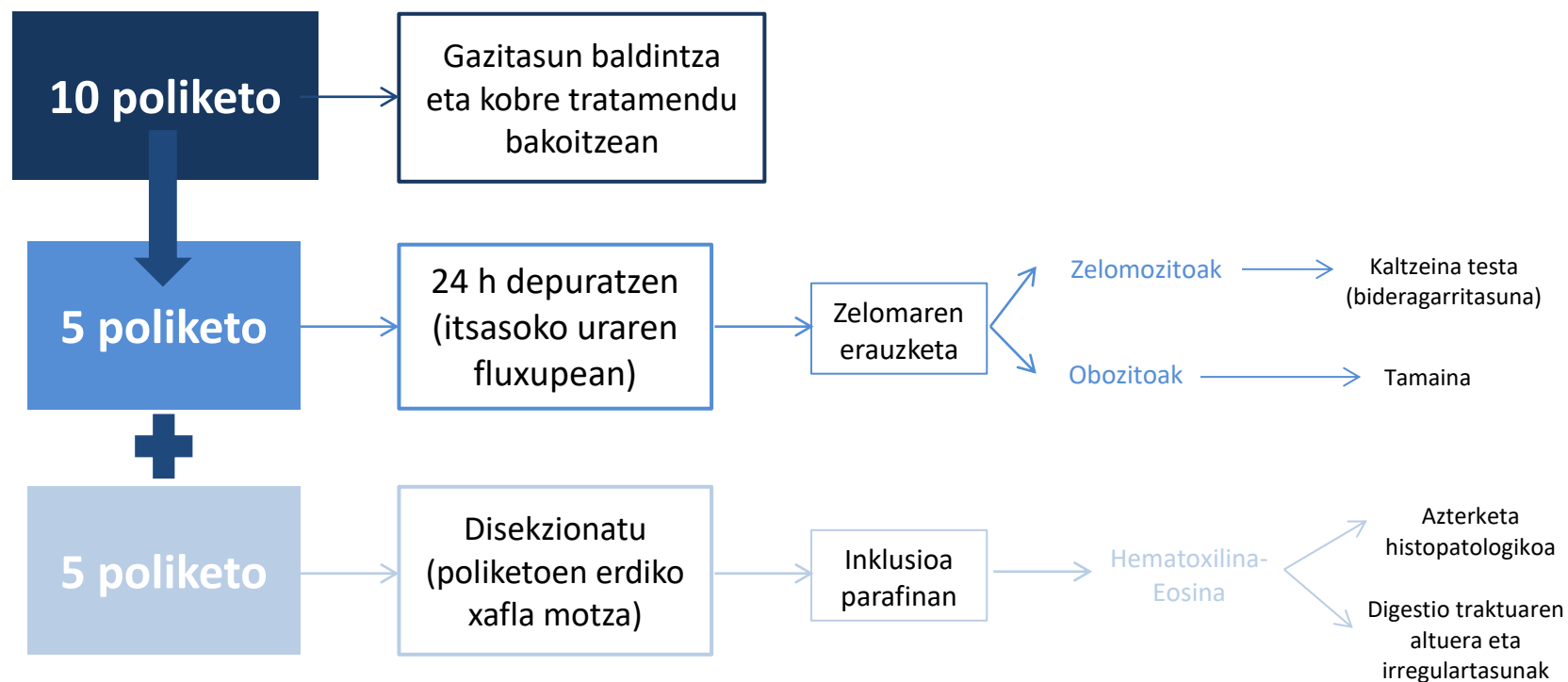
Eranskinak

I.ERANSKINA:



1.Irudia. *Hediste diversicolor* poliketoaren zeharkako mozketaren eskema, atal anatomikoak adierazita²⁵.

II. ERANSKINA:



2. Irudia. Poliketoein buruturiko azterketak. Gazitasun baldintza eta kobre tratamendu bakoitzeko 10 poliketoen erabilera, prozesamendua eta analisisa laburtzen dituen fluxuzko diagrama.

III. ERANSKINA:

1. Taula. **Deshidratazioaren protokoloa.** Laginen prozesamendua formalinan (%10 formaldehido) fixatu ondoren eta parafinazko takoetan inkluitu baino lehen.

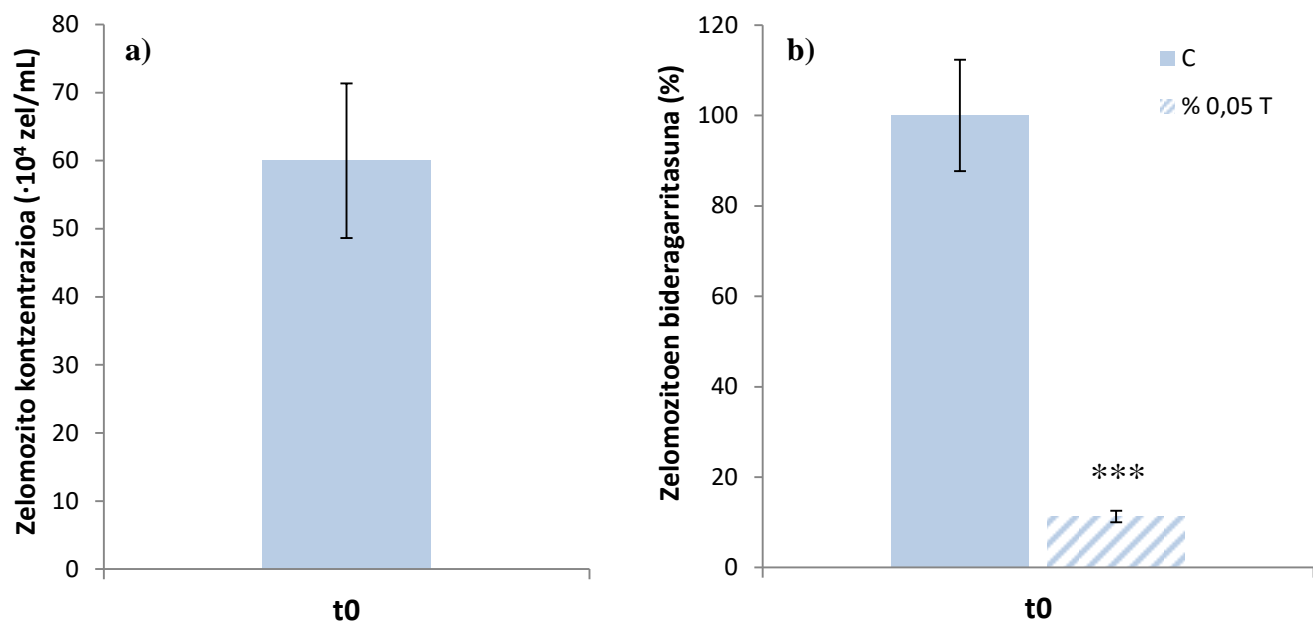
URRATSA	DENBORA
%70 etanola	1 ordu
%96 etanola	1 ordu
%96 etanola	1 ordu
Etanol absolutua	1 ordu
Etanol absolutua	1 ordu
Xilola:Etanol absolutua 1:1 diluzioa	1 ordu
Xilola	1 ordu
Xilola	1 ordu
Parafina (55-60°C)	2 ordu
Parafina (55-60°C)	2 ordu
Parafina (55-60°C)	2 ordu

IV. ERANSKINA:

2. Taula. Hematoxilina-Eosina tindaketaren protokoloa.

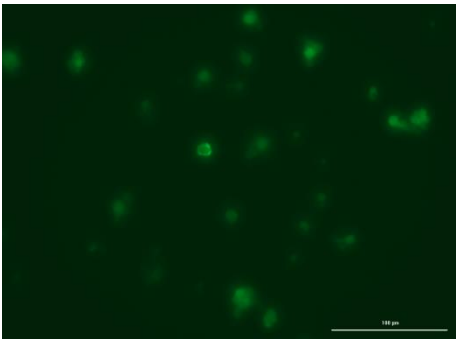
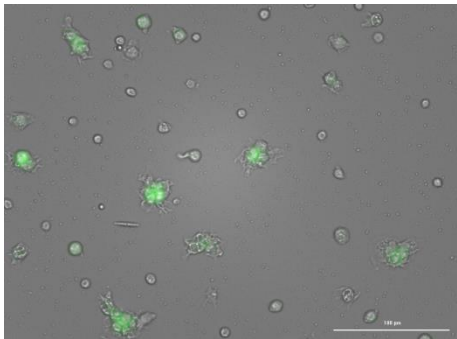
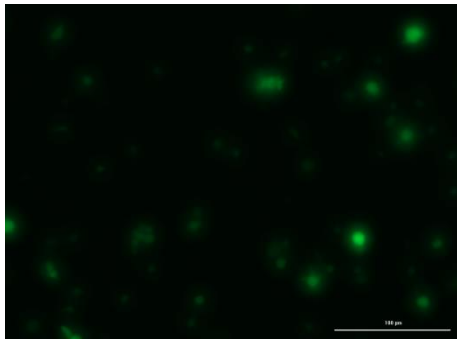
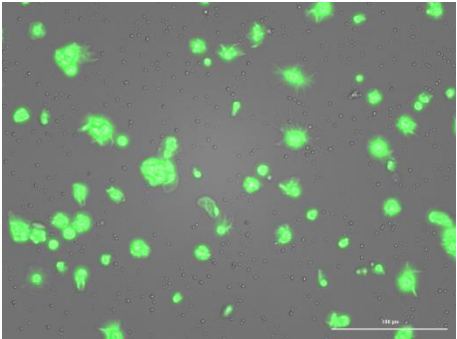
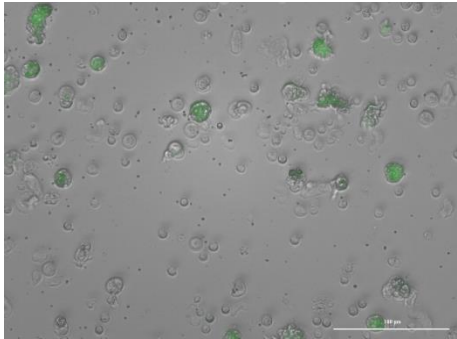
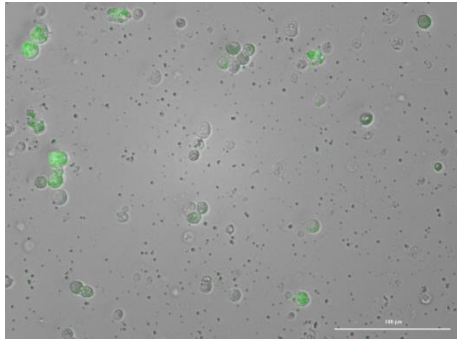
URRATSAK	DENBORA
Xilola	10 min
Xilola	10 min
Etanol absolutua	2 min
Etanol absolutua	2 min
%96 etanola	2 min
%70 etanola	2 min
H ₂ O	5 min
Hematoxilina	4 min
Alkohol azidoa	10 s
H ₂ O	5 min
Litio karbonatoa	10 s
H ₂ O	1 min
Eosina	1:30 min
H ₂ O	1 s
H ₂ O	2 min
%70 etanola	2 min
%96 etanola	2 min
Etanol absolutua	2 min
Etanol absolutua	2 min
Xilola	5 min
Xilola	5 min

V. ERANSKINA:



3. Irdia. t_0 denbora. a) Zelomozito kontzentrazioa. Poliketoetatik erazitako zelomozito soluzioaren jatorrizko kontzentrazioaren (zel/mL) batez bestekoa eta desbiderapen estandarra (hemozitometroko lau karratuetako balioak aintzat hartuz). **b) Zelomozitoen bideragarritasuna.** Ajustatutako zelomozito disoluzioen ($2 \cdot 10^5$ zelula/mL) bideragarritasuna eta desbiderapen estandarra. PBS-rekin inkubatutako (C) zelomozitoak bideragarritasunaren %100 gisa kontsideratuz, Triton-X-rekin (%0,05 T) inkubatutakoen bidez hauekiko portzentajea neurtu zen. Izartxoek (*) %0,05 Triton-X putzuko aldakortasunak Triton-X gabeko putzuarekiko estatistikoki esangarriak direla adierazten dute (***) $p < 0,001$).

VI. ERANSKINA:

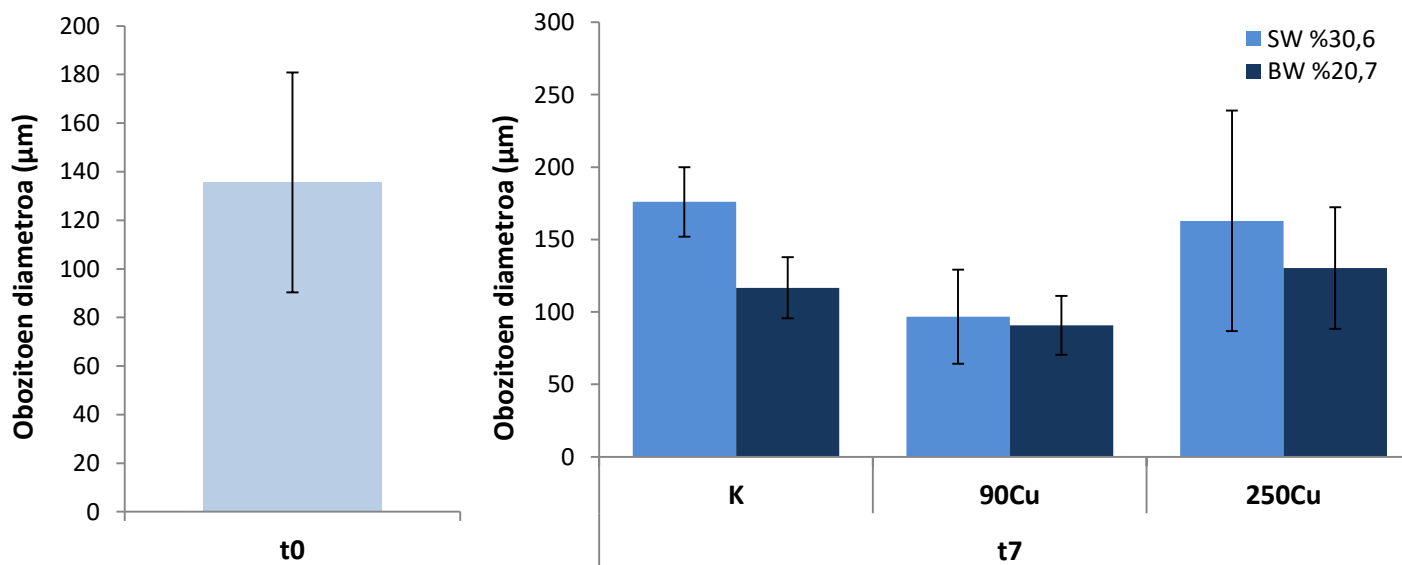
	K (PBS, kaltzeina)	⁹⁰ Cu (PBS, kaltzeina)	²⁵⁰ Cu (PBS, kaltzeina)
SW			
BW			

4. Irudia. Kaltzeina testaren argazkiak. Tratamendu eta gazitasun ezberdinen jatorrizko zelomozito kontzentrazioan erauzkinen PBS putzuak, 490 nm-ko argiarekin kitzikatu ostean, kaltzeinaren fluoreszentzia erakutsiz (Cytation 3 Cell Imaging multi-mode reader erabilia). Fase kontrasteko eta fluoreszentziako mikroskopioko irudien muntaiak Gen5 Image softwarearekin burutu ziren. Muntaietan agertzen diren puntu beltzak soluzioan aske gelditutako kaltzeina dira. Mikroplakara itsatsitako eleozitoek luzakinak garatzen dituzten artean, esekiduran daudenek itxura borobila erakusten dute. Eskala-marra = 100 µm.

VII. ERANSKINA:

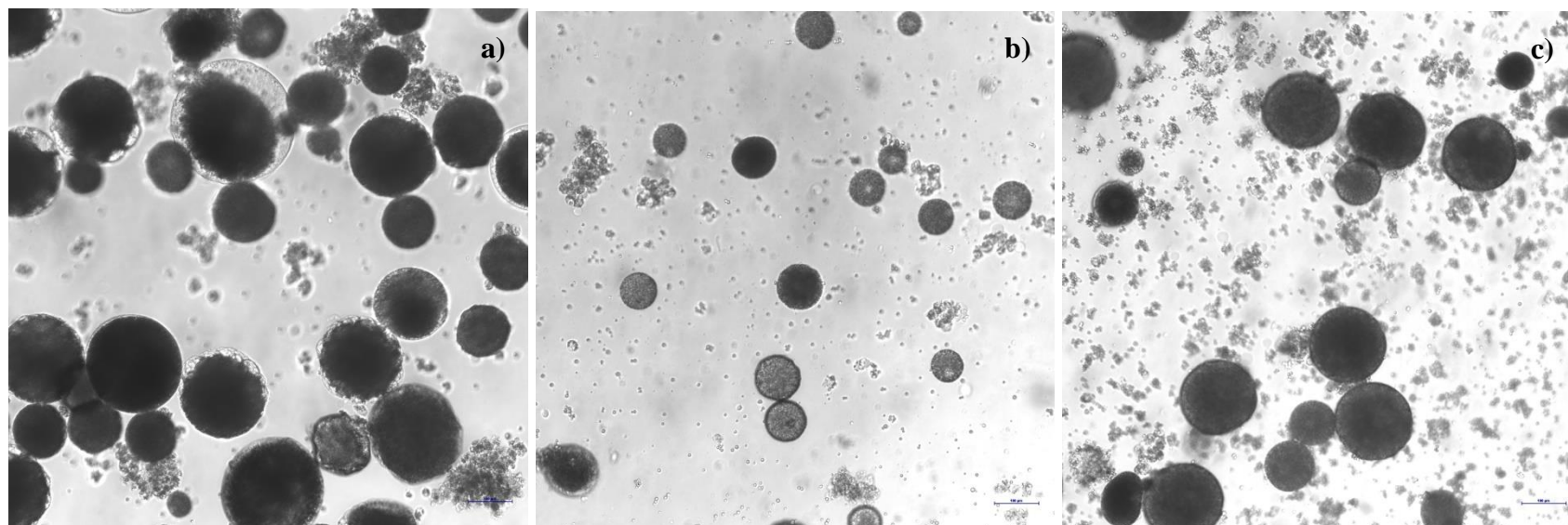
3. Taula. Obozitoen diametroa. t_0 denborako poliketoetatik eta gazitasun (SW eta BW) eta kobre tratamendu (K, 90Cu eta 250Cu) ezberdinetan inkubatutako poliketoetatik erauzitako obozitoen diametroen batez bestekoak eta desbiderapen estandarrak. Obozitoen diametroaren balioak μm -tan daude.

t_0	t_7					
	SW %30,6			BW %20,7		
	K	90Cu	250Cu	K	90Cu	250Cu
135,61±45,23	175,96±23,90	96,73±32,45	162,83±76,17	116,65±21,14	90,71±20,35	130,25±42,00



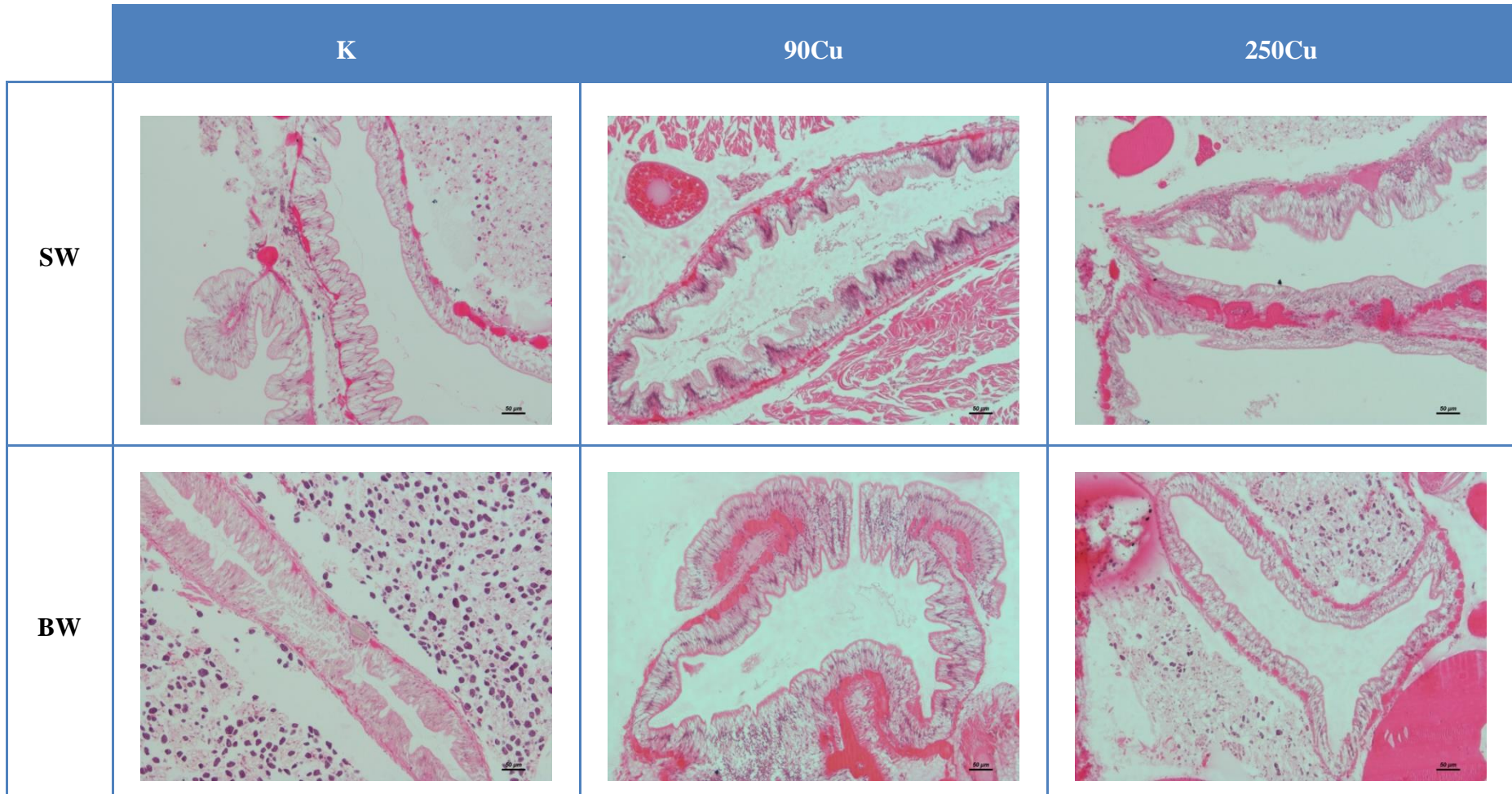
5. Irudia. Obozitoen diametroa. Gazitasun eta kobre tratamendu ezberdinetan inkubatutako poliketoetatik erauzitako obozitoen diametroen batez bestekoa eta desbiderapen estandarrak.

VIII. ERANSKINA:



6. Irudia. Poliketoetatik erauzitako obozitoen argazkiak. a) t_0 denborako poliketoen obozitoak. **b)** BW gazitasuneko 90Cu tratamenduan inkubatutako poliketoen obozitoak. **c)** BW gazitasuneko 250Cu tratamenduan inkubatutako poliketoen obozitoak. Hondoan agertzen diren orbainak esperma plakak dira. Eskala-marra = 100 μm .

IX. ERANSKINA:



7. Irudia. Hematoxilina eosinaz tindatutako laginen digestio traktuak. Tratamendu eta gazitasun ezberdinetan inkubatutako poliketoen digestio traktuaren argazkiak, NIS-Elements F32 softwarea erabiliz ateratakoak. Laginak aztertzeko Nikon Eclipse TI-S mikroskopio optikoa baliatu zen. Kobre esposizioa pairatutako laginetan aldaketa adierazgarririk behatu ez zen arren, 250Cu tratamenduko poliketoek odol-hodien dentsitate altuagoa erakutsi zuten digestio traktuaren inguruan. Eskala-marra = 50 μm.

X. ERANSKINA:

4. Taula. Uraren parametroak. Esperimentuaren erdialdean neurturiko tratamendu ezberdin bakoitzeko uraren parametroak (temperatura, pHa, disolbatutako oxigeno portzentajea eta gazitasuna, eroankortasunaren bitartez adierazia).

	Txorrotako itsas ura	SW						BW					
		K		90Cu		250Cu		K		90Cu		250Cu	
		1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
Temperatura (°C)	17,9	16,5	16,7	16,5	16,4	16,7	16,3	16,7	16,8	16,7	16,6	16,7	16,7
pHa	7,63	7,77	7,81	7,81	7,82	7,81	7,78	7,75	7,75	7,9	7,92	7,98	7,91
Disolbatutako oxigenoa (%)	89,8	96,1	94,1	94,5	94,3	94,1	92,6	96,6	92,1	97,1	97,1	97,1	95,6
Eroankortasuna (gazitasuna)	33	38,48	38,82	38,3	38,58	38,82	37,99	25,62	25,85	26,1	26,33	25,99	25,61