

Gradu Amaierako Lana
Biologiako Gradua

***Mytilus galloprovincialis* muskuiluaren
aklaramendu tasa eta NPSen azterketa
gazitasun ezberdinen aurrean**

Egilea:
Laura Burgos Barroso
Zuzendaria/Director/a:
Irintzi Ibarrola

Laburpena

Mytilus galloprovincialis muskuilua gazitasun ezberdinetara jarri da aklaramendu tasan honek duen efektua ikusteko asmoz. Erabilitako gazitasunak ur gazia %100ean, %70ean eta %40an izan dira eta hiru esperimentu ezberdin jarraituz atera dira ondorioak. Hiru esperimentu hauetan muskuiluen aklaramendu tasak neurtu dira baldintza desberdinetan eta hirugarren esperimentuan NPS kontzentrazioaren neurketa kolorimetrikoa ere egin da. Ikusi da %70ko diluzioak ez duela aklaramendu tasan eraginik sortzen kasu guztietan eta %40ko diluzioak ere ez duela eraginik sortzen soilik aldaketa graduala bada. %40 gazitasunean, aldaketa gradualik gabe, mantendu diren muskuiluen berehalako erantzuna balbaren itxiera izan da, aklaratzeari utziz, baina denborarekin aklaratzeko gaitasuna berreskuratu dute. Aklimatazio horren arrazoia aurkitzeko asmoz, azkeneko esperimentuan NPS edo aminoazido askeen determinazioa egin da, bai brankian bai muskulu abduktorean. Gazitasuna jaisten denean NPSen kontzentrazioa behera egiten duela ikusi da muskuiluetan, bolumen zelularra erregulatuz. Efektu hau muskulu abduktorean adierazgarritasun handiagoarekin nabaritu da.

Sarrera

Mytilus galloprovincialis estuarioetan bizi den muskuilua da. Estuarioak aldaketa nabariak eta azkarrak jasan ditzake ingurune fisiko eta kimikoan, bai itsasaldi, haize indarraren eta euri indartsuen eraginez (Chaparro et al, 2008; Sadok et al, 1997; Wang et al, 2011). Estuarioen ezaugarri garrantzitsu bat gazitasun aldaketa da, itsas uraren sarrera eta irteera direla eta, ibaiko urarekin diluitzen dena (Chaparro et al, 2008). Gazitasunaz gain, beste ezaugarri batzuk ere aldatzen dira, hala nola, oxigenoa, tenperatura eta uhertasuna (Sadok et al, 1997). Hori dela eta, muskuiluak oso aldakorra den bizileku batean bizi dira eta inguruneak haien parametro fisiologikoetan zer nolako eragina duen aztertzea interesgarria

litzateke. Gazitasuna, konkretuki, prozesu fisiologiko askoren eta jokabide askoren erregulatzailerik bezala deskribatu da (Chaparro et al, 2008)

Moluskuak animalia osmokonunztagarriak dira, inguruneko uraren aldaketak jarraitzeko haien barne medioaren kontzentrazio osmotikoak aldatzen zaien organismoak (Ruiz et al, 2008). Hau da, animalia hauen odola kanpo medioarekin oreka osmotikoan aurkitzen da (Resgalla et al, 2007). Ezaugarri hau dela eta, gazitasun aldaketak kaltegarriak izan daitezke animalia hauentzat, zelulen puztea edo uzkurtzea eraginez, ur sarrera eta irteeraren ondorioz, hurrenez hurren. Egoera berri hau hain muturrekoa ez bada ez da plasmolisia gertatuko baina zelularen funtzioak gora behera gertatuko dira, hau da, balantze energetikoan parte hartzen duten hainbat aldagarri fisiologikoen abiadura aldatuko da, haien artean, esaterako, aklaramendu tasa, elikagaien ingestio-tasaren erantzule nagusia. Hori dela eta, muskuiluen lehenengo erantzuna balbaren itxiera izaten da (Sadok et al, 1997; McFarland et al, 2013). Portaera erantzun hau estres osmotikoa ekiditen du animalia kanpo mediotik babesten baitu. Hala ere, egoera txarretatik denbora laburrean babesteko baino ez du balio (McFarland et al., 2013).

Nahiz eta osmokonunztagarriak izan, espezie eurihalinoak dira muskuiluak, hau da, gazitasun ezberdinen aurrean bizitzeko gai dira, izan ere, alde intrazelularren konposatu organikoak aktiboki erregulatu ditzakete (Sadok et al, 1997). Gazitasun aldaketa bat gertatzean oskolaren itxiera gertatzen da, horren ondorioz animalia ingurunetik isolatuta egongo da, beraz, ez du elikagairik ezta oxigenorik lortuko. Ondorioz, denborarekin oskola ireki beharko du ura iragazteko oxigeno eta elikagaia lortzeko eta hori gertatzean ingurumenaren gazitasunak eragina izango du eta zelulek fluxu osmotiko pasiboak pairatuko dituzte euren zelulen bolumena aldatzen delarik. Aldaketa horiek martxan ipintzean sortzen den erantzuna bolumen zelularren erregulazioa da, zelula barneko osmolito nitrogenatuen kontzentrazioa erregulatuz (Sadok et al, 1997). Beraz, zelula barneko osmolitoen erregulazioa gazitasunarekiko tolerantzia baimentzen duen mekanismoa da. Itsas bibalbioetan hemolinfa oinarritzko osagai osmotikoak ioi

inorganikoak dira, baina aminoazido askeak eta haien deribatuak zelularen oinarritzko efektore osmotikoak dira. Osmolito nitrogenatu hauek, metabolikoki garestiak dira eta moldaera zelularrean gehien aldatzen direnak dira (George eta Damodaran, 1999). Hori dela eta, bilbalbio eurihalinoen gaitasuna erregulazio osmotikoa egiteko tolerantzia limitearen eta zelula barneko sistemaren solutuen erabilgarritasunaren arabera izango da (George eta Damodaran, 1999). Esan bezala, efektore garrantzitsuenak azido organikoak dira, bereziki amino askeak (Chandran eta Damodaran, 1999), eta hauen kontzentrazioa aminopeptidasa-1 entzimak erregulatzen du (Resgalla Jr et al, 2007). Aminoazido askeak ornogabeen ehun lehorraren pisuaren % 6-11 osatzen dute. Alanina, glizina eta taurina molusku itsastarren aminoazido aske ugariak dira (Kube et al, 2007). Aminoazido hauek aminoazido neutroak dira, bolumen zelularrean erregulaziorako erabiltzen diren aminoazido osmoteragarriak dira, hau da, euren kontzentrazioaren aldaketek ez dute eraginik entzima zitoplasmatikoen aktibitatean. Konposatu hauek NPS (ninhydrin-positive substances) izena hartzen dute (Roy et al, 2007).

Muskuiluen parametro fisiologiko garrantzitsu bat aklaramendu tasa (CR) da. Aklaramendu tasa definitzen du denbora tarte batean partikulaz garbitzen den ur bolumena (Guzmán-Agüero et al, 2013; McFarland et al, 2013; Rajesh et al, 2001). Muskuiluen aklaratzeko aktibitatea aldakorra da, fitoplankton kontzentrazioaren, janari partikulen kalitate eta tamainaren eta animalien tamainaren arabera da (Rajesh et al, 2001). Habitat naturalaren hainbat parametro ere eragin dezakete, hala nola, tenperatura, gazitasuna eta ur fluxua (Rajesh et al, 2001). A klorofilaren kontzentrazioak ere eragina du aklaramendu tasan (Chaparro et al, 2008). Hala ere, gazitasunak hainbat espezieetan aklaramendu tasan gehien eragiten duen parametroa bezala deskribatu da (Chaparro et al, 2008; Enriquez Ocaña et al, 2012). Hori dela eta, hain garrantzitsua da honen efektua zein den aztertzea.

Bi parametro hauek haien artean lotuta daude, izan ere, ikusi da ornogabe itsastarrek gazitasun aldaketei aurre egin ditzaketela eta aklaramendu tasa mantendu dezaketela NPSen bolumen zelularrean eraenketari esker (Roy et al, 2007).

Helburuak

Ikerketa honetan gazitasuna aklaramendu tasan zer nolako eragina duen aztertzen da, bai berehalako erantzuna, bai epe luzeko erantzuna, hots, aklimatazioa. Horrez gain, aklimatazioan parte hartzen duten parametroak ikertu nahiaz, NPS kontzentrazioaren aldaketa denboran zehar aztertzen da gazitasun ezberdinetan. Lortutako emaitzekin muskuiluek estuarioetan gertatzen diren aldaketei nola egiten dieten aurre jakin daiteke, hau da, hain ingurune aldakorretara nola moldatzen diren jakin daiteke.

Material eta Metodoak

1. Muskuiluen bilketa eta mantenua

Muskuiluak Bizkaiko kostaldean jaso dira, Algortako portu zaharrean, non Bilboko itsasadarraren eraginagatik gazitasun aldaketak pairatzen dituzten. Esperimentu bakoitza hasi baino lehen aste bat laborategian mantendu dira itsas uretan laborategiko baldintzetara ohitzeko. Muskuiluak ur bainuan egon dira tenperaturaren eragina handia izan ez dezan eta algaz elikatu dira. Itsas ur diluituan zeuden muskuiluek jaso duten elikagaia ere diluituta egon da. Horrez gain, bi egunero muskuiluen ura aldatu da hondakinez garbitzeko.

2. Esperimentuaren diseinua

a) Lehenengo esperimientua

Lehenengo esperimentuan hiru gazitasun baldintza ezberdin prestatu dira, 3 tanke desberdinetan. Lehenengoan itsas ura %100koa izan da, bigarrenean %70 itsas ura eta %30 ur geza, eta hirugarrenean %40 itsas ura eta %60 ur geza. Baldintza hauetan 3 eguneko mantendu dira, aklaramendu tasa neurtu baino lehen. %40 itsas ureko diluzioko

muskuiluetan gazitasun aldaketa bortitza ez jasateko egun bat %70 itsas uretan mantendu dira, %40ko diluzioan 3 egun egon baino lehen. Tanke guztiak aireztatuta egon dira eta bakoitzari dagokion alga kantitatea jarri zaio, gazitasun portzentaje berera diluituta.

b) Bigarren esperimentua

Bigarren esperimentuan lehenengo metodo berdina jarraitu da baina oraingoan 5 muskuilu erabili dira. Kasu honetan, aldaketa graduala jarraitu beharrian, muskuiluak laborategian aste bat egon ondoren, talde bakoitza %100, %70 eta %40 gazitasun tankeetan banatu dira. Lehenengo aklaramendu tasaren neurketa muskuiluak tankean sartu eta egun batera egin da. Ondoren beste neurketak bigarren eta laugarren egunean egin dira. Esperimentu honetarako muskuilu berdinak mantendu dira egun desberdinetan zehar baina ez da pisu lehorra neurtu.

c) Hirugarren esperimentua

3. esperimentuan berriz ere metodologia berdina erabili da aklaramendu tasa neurtzeko. Kasu honetan bi taldetan baino ez da aklaramendu tasa neurtu. Itsas ura %100ean dagoen tanke bat eta itsas ura %40an dagoen beste tanke bat prestatu dira. Muskuiluak laborategian aste bat egon eta gero eta talde bakoitza tanke batean sartu eta gero aklaramendu tasaren lehengo neurketa egin da muskuiluak tankeetara sartu eta hurrengo egunean. Ondoren beste neurketak egin dira bigarren, laugarren, zortzigarren eta hamaseigarren egunetan. Egun bakoitzean 12 muskuiluen aklaramendu tasaren neurketa egin da, 6 talde bakoitzeko. Muskuiluak laborategian mantendu diren egunetan elikatuta egon dira eta ura aldatu zaie esperimentua irauten zuen bitartean egoera onetan mantentzeko.

Aklaramendu tasa neurtzeaz gain, muskuiluen brankien eta muskulu abduktorearen NPSen kalkulua egin da

3. Aklaramendu tasaren neurketa esperimentalak

Aklaramendu tasa neurtzeko 3L-tako ontziak prestatu dira, 10 konkretuki, 9 muskuiluentzako eta bat kontrolerako. Guztietan airea sartu da ura oxigenatuta egon dadin eta alga kantitate bat bota da (10-15mL tartean), 25000-35000 partikula/mL kontzentrazioa lortzeko helburuarekin. Horrez gain, ontziak ur tanke batean mantendu dira neurketan zehar tenperatura gutxi gora behera konstante mantentzeko asmoz, honek esperimentuan eraginik izan ez dezan. Antzeko diseinua jarraitu da beste ikerketa batzuetan (Sarà et al, 2008). Muskuiluak 5 minutu utzi dira ingurune berrira ohitzeko eta jarraian neurketarekin hasi da. Laginak denboran zehar hartuz joan dira eta partikula kontzentrazioak neurtu dira Multisizer partikula kontagailuari esker. Ondoren kalkuluak egiteko Coughlan (1969) formula erabili da, beste ikerketa batzuetan egin den moduan (Wang et al, 2011; McFarland et al, 2013). Aklaramendu tasa kalkulatzeko formula honako hau da:

$$dC/dt = -C (CR/V) + SR$$

Honako formularen dC/dt C kontzentrazio partikulen beherapen tasa da, t denbora konkretu batean. Aklaramendu tasa CR izango da eta L/h-tan neurtzen da, V bolumena litrotan (L) izango da, SR sedimentazioa (partikula/h), C partikula kontzentrazioa (partikula/L) eta t denbora orduetan (h) izango dira. Ekuazio hau $t=0$ -tik $t=t$ -ra integratzen bada, honako ekuazioa lortzen da:

$$\ln C_0 - \ln C_t = (CR/V + SR)t$$

Honako ekuazioan C_0 $t=0$ denboran partikulen kontzentrazioa izango da eta C_t $t=t$ denboran partikulen kontzentrazioa izango da. aklaramendu tasa (CR) kalkulatzeko $\ln C_0 - \ln C_t$ (y) eta t (x) arteko erregresio lineala egingo da, izan ere, lortutako lerroaren malda, b, honakoa izango da: $b = CR/V + SR$. Sedimentazio tasa kalkulatzeko erregresio lineal berdina egingo da baina kontroleko ontziak emandako datuak erabiliz eta lerro horren malda SR izango da. Bai esperimentu honetan bai beste bietan SR 0 izan da, partikulen sedimentazioa gertatu ez dela esan nahi duena, hori dela eta balio hau ez da ekuazioan kontuan hartu.

3.1. Tamainarekiko estandarizazioa

Aklaramendu tasaren estandarizazioa lortzeko muskuilu bakoitzaren pisu lehorra lortu da. Horretarako muskuiluen disezioa egin da eta labean mantendu dira laginak lehortu arte. Egun bat pasa eta gero laginak pisatu egin dira eta pisu lehorra lortu da. Muskuiluen tamaina ezberdinak aklaramendu tasan eragina izan dezakeenez, aklaramendu tasa estandarizatu behar izan da pisuarekiko. Aklaramendu tasaren estandarizaziorako honako formula hau erabili da:

$$CR_{std} = CR_{exp} (W_{erref}/W_{exp})^b$$

Ekuazio honetan CR_{std} aklaramendu tasa estandarizaturik izango da, CR_{exp} esperimentuan lortutako aklaramendu tasa izango da, W_{erref} , erreferentziako pisua izango da, guztientzat balio berdina izango dena, eta W_{exp} esperimentuan lortutako pisu lehorra izango da. b balioan 0,56 erabili da, *M. galloprovincialis* muskuilurako definituta dagoena (Iglesias et al, 1996).

4. NPSen neurketa esperimentalak

Muskuiluen brankien eta muskulu abduktorearen NPSen kalkulua egiteko aklaramendu tasa neurtu ondoren muskuiluen disezioa egin da. Disezioan muskuilu bakoitzetik muskulu zati bat eta brankia zati bat hartu dira, hidrogeno likidoz izoztu dira eta eppendorfetan sartu ondoren izozgailuan gorde dira. Gainontzekoa labean sartu da eta pisu lehorra neurtzeko erabili da, ondorengo aklaramendu tasaren estandarizazioa egiteko. Muskuilu guztien muskulu eta brankien laginak izan ondoren laginen liofilizazioa egin da. Honekin laginak prest egongo dira NPS kontzentrazioaren neurketa egiteko.

Horretarako NPSen kontzentrazioaren neurketa kolorimetrikoa (Shunmway, 1977) burutu da. Metodoan deskribatuta dago muskuilu ehunaren 10mg pisatu behar direla eta honi 1mL Etanol gehitu, kantitate hau %80 izanda. Kasu honetan, lagin bakoitzaren pisua neurtu da eta horri dagokion Etanol kantitatea gehitu zaio %80ean egon dadin. Lagina eta honi

dagokion etanol kantitatea Pyrex erroskadun sai-hoditan gehitu dira eta hauek 100°C-ko ur bainuan sartu dira, 10 minutuz. Ondoren 5 minutuko zentrifugazioa egin da eta honekin NPSen erauzketa lortuko litzateke.

Bigarren pausu batean, NPSen zehaztapenerako gainjalkinaren 50µL pipeteatu dira Pyrex sai-hodi luzeetara, lagin bakoitzeko 3 erreplika lortuz. Ondoren ur distilatuko 2 mL gehitu dira, Ninhidrina soluzioko 4 mL eta Hidrazina sulfato soluzioko 2 mL. Ninhidrina disoluzioa lortzeko 6,7mg Ninhidrina, 500mL 2-Metoxietanola, 28,5mL azido azetiko, 100mL azetato sodiko tanpoia 4N (pH=5,3-5,5) eta ur distilatua (1L lortu arte) nahastu behar dira. Hidrazina sulfato disoluzioa lortzeko 260mg hidrazina sulfato, 80µL azido sulfuriko kontzentratua eta ur distilatua (1L lortu arte) nahastu behar dira. Lagin bakoitzeko 3 errepliketaz gain, bi sai-hodi kontrol prestatu dira, laginak ur distilatuz ordezkaturik. Kolorea garatzeko sai-hodi guztiak 15 minutuz berotu dira 100°C-ko ur bainuan. Ondoren sai-hodiak harraskako urarekin hoztu dira eta 2mL ur distilatua gehitu da bakoitzari. Azkenik laginen absorbantzia neurtu da 570nm-ko uhin luzeran, espektrofotometroan.

NPS-en kontzentrazioa (Y) kalkulatzeko, kalibratze zuzena eraiki zen leuzina aminoazidoarekin honako ekuazioa lortuz: $y = 38,7ABS - 1,8$.

Kalkuluak egiteko lehenengo hiru errepliketako absorbantzien arteko batezbestekoa atera da. Ondoren batezbesteko absorbantzia kalibratze zuzenaren ekuazioan sartu da eta horrekin NPSen kontzentrazioa µg/mL-tan lortu da. Lortu nahi den balioa µg NPS/ mg ehunean lortu nahi da eta horretara iristeko hasteko lortutako balio bider 2 biderkatu behar da, 2 mL-tan diluitu delako. Ondoren, etanolaren diluzio faktorearekin biderkatu behar da, lagin bakoitzean ezberdina izango dena, izan ere, hasieran etanol kantitate ezberdina gehitu da. Azkenik, lortutako balio hori hasierako ehun mg-tik zatituko dugu, azkeneko balioa µg NPS/ mg ehun moduan adierazita lortuz.

5. Datuen tratamendu estatistikoa

Analisi estatistikoak egiteko SPSS programa erabili da.

a) Lehenengo esperimientua

Lehenengo esperimientuko emaitzen esangarritasuna konprobatzeko faktore bakarreko ANOVA jarraitu da eta batazbestekoen arteko konparaketak egiteko jarraitu diren Post-hoc probak Tukey, Scheffe eta Dunnett izan dira.

b) Bigarren esperimientua

Pisu lehorra ezin denez lortu, aklaramendu tasaren estandarizazioa ezin da egin baina muskuilu berdinak erabili direnez neurketa bakoitzean denborak talde bakoitzarentzat konparagarriak dira. Horrez gain, kontuan izan behar da 3 neurketetan tamaina antzeko muskuiluak erabili direla, beraz, pisuan ez litzateke aldaketa handirik egon behar. Hau kontuan hartuta, ANOVA egin da errepikatutako neurketekin, eta Post Hoc test moduan Bonferroni proba egin da.

c) Hirugarren esperimientua

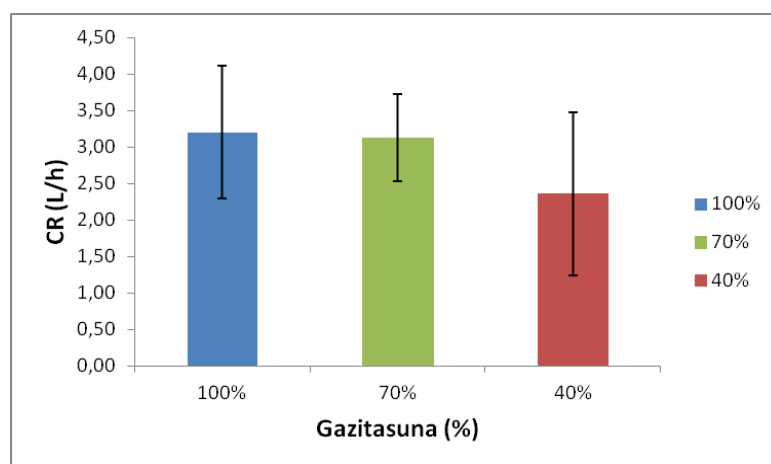
Oraingoan estatistikoki bi parametro ezberdin aztertu behar dira, alde batetik aklaramendu tasa eta bestetik NPS kontzentrazioak bai brankian bai muskulu abduktorean. Hiru kasuetan faktore bakarreko ANOVAk burutu dira, eta bakarrik brankiako NPSen kasuan bariantzak normalak izan dira, non Tukey, Scheffe eta Dunnett probak egin diren. Beste bi kasuetan ez da Levene testa gairiditu eta hori dela eta neurketa ez parametrikokoak egin dira. Aklaramendu tasaren kasuan Kruskal-Wallis testa burutu da eta muskulu NPSen kasuan Mann-Whitney testa eta Kruskal-Wallis testa burutu dira.

Emaitzak

1. Esperimientua

Lehenengo esperimientuan ez zen aldaketarik sumatu aklaramendu tasan 3 talde desberdinen artean. %100-ko gazitasunean zeuden muskuiluetan aklaramendu tasa 1,91L/h

eta 5,03L/h tartekoa izan zen, 3,20L/h-ko batezbestekoarekin. %70-ko gazitasunean zeuden muskuiluen aklaramendu tasa txikiena 2,12L/h-koa zen eta handiena 3,97L/h-koa zen. Kasu honetan batezbestekoa 3,13L/h zen. Azkeneko taldean, %40ko diluziokoa, aklaramendu tasa 1,50L/h eta 3,50L/h tartekoa zen eta muskuilu batean 0 izan zen, hau da, ez zuen aklaratu. 1. Irudian 3 taldeen batezbestekoak irudikatuak daude bakoitzari dagokion desbiderazio estandarrekin.



1. Irudia. Lehenengo esperimentuaren hiru taldeen aklaramendu tasaren batezbestekoak eta desbiderapen estandarrak

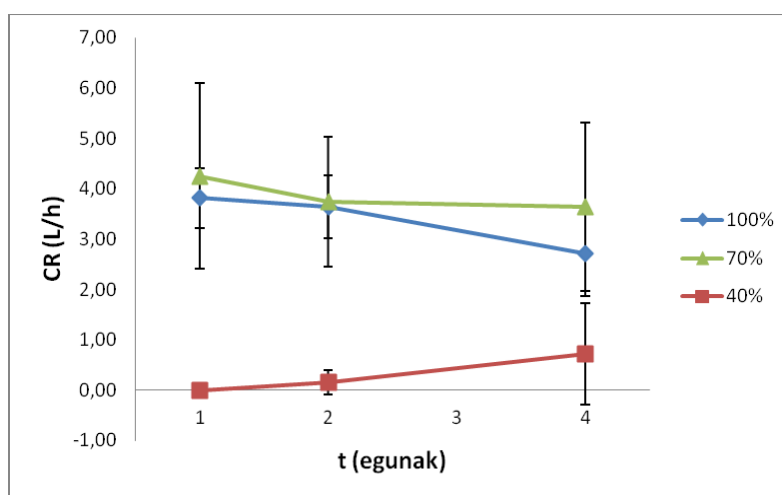
Estatistikari dagokionez, faktore bakarreko ANOVA egin zen eta Levene proba gainditu zuen. Egindako 3 testetan (Tukey HSD, Scheffe eta Dunnett) $p > 0,05$ izan zen talde guztien artean binaka hartuta. Horrez gain, baldintza $p = 0,111$ izan zen (1. Taula). Beraz, desberdintasunak ez dira esangarriak, eta ondorio moduan esan daiteke aldaketa gradualak jasan eta gero gazitasunaren aldaketan, aklaramendu tasa ez dela aldatzen.

1. Taula. ANOVAREN laburpena

Parametroa	Iturria	Askatasun graduak	Karratuen batura	Karratuen media	F	p
CR (L/h)	Baldintza	2	3,921	1,960	2,411	0,111

2. Esperimentua

Lehenengo esperimentuan gazitasun aldaketa gradualak inolako eraginik ez zuela ikusita hurrengo esperimentu bat planteatu zen. Bigarren esperimentu honetan, muskuiluak hiru gazitasun ezberdinetan jarri eta gero, jarraipena egin zen lehenengo, bigarren eta laugarren egunean, muskuilu berdinentzat. %100ko gazitasunean aurkitzen ziren muskuiluak 3,81L/h batezbesteko aklaramendu tasa aurkeztu zuten lehenengo egunean, 48 orduetan 3,64L/h-ko aklaramendu tasa eta 4 egunetan 2,71L/h-ko aklaramendu tasa. %70ko gazitasuneko muskuiluak aklaramendu tasa antzeko balioak aurkeztu zituzten: 4,25L/h lehenengo egunean, 3,74L/h bigarren egunean eta 3,64L/h laugarren egunean. %40ko diluzioan zeuden muskuiluak, aldiz, erantzun ezberdin bat eman zuten, izan ere, lehenengo egunean aklaramendu tasa 0 izan zen, hau da, ez zuten batere aklaratu. Bigarren egunean bi muskuilu baino ez zuten aklaratu 0,54L/h eta 0,22L/h-ko aklaramendu tasak aurkeztuz, guztien artean 0,15L/h-ko batezbestekoa emanaz. Laugarren egunean bi muskuilu hauek izan ziren aklaratu zuten bakarrak baina aklaramendu tasa handitu zutela ikusi zen, 1,46 eta 2,14L/h-ko aklaramendu tasak aurkeztuz, 0,72 batezbestekoarekin taldeko muskuilu guztiak kontuan hartuta. Gainontzeko muskuiluak aklaratu gabe jarraitu zuten.



2. Irudia. Bigarren esperimentuaren iragazte tasen batezbestekoak eta desbiderapen estandarrak.

Emaitza hauek ikusita %40ko gazitasun diluzioan zeuden muskuiluak gainontzekoei erantzun ezberdin bat eman zutela ikus daiteke 2.irudian. Ezberdintasun hau baieztatzeko asmoz, eta muskuiluak neurketa ezberdinetan berdinak zirela kontuan hartuta, errepikatutako neurketetarako ANOVA bat egin zen. ANOVAN ikusi zen egunek ez zutela eraginik eta egunak baldintza elkarrekin ere ez, hala ere, baldintzak ezberdintasunak eragiten zuela ikusi zen (2.Taula). Bonferroni proba egin eta gero ikusi zen %40ko gazitasunean aurkitzen ziren muskuiluek emandako erantzuna ezberdina zela bai %100ko muskuiluek bai %70ko muskuiluek emandako erantzunarekin alderatuz ($p=0,000$). %100ko gazitasunaren eta %70 gazitasunaren artean ez zen ezberdintasunik aurkitu. Hortaz, ondorioztatu daiteke aldaketa graduala jasan ez denean gazitasun baxuetan aklaramendu tasa behera egiten du edo muskuiluek ez dute aklaritzen. Horrez gain, ikus daiteke ere, denborarekin aklaratzeko gaitasuna berreskuratzeko joera hartzen dutela muskuiluek.

2. Taula. Aklaramendu tasan eragina duten parametroen estatistikaren laburpena

Parametroa	Iturria	Askatasun graduak	Karratuen batura	Karratuen media	F	p
CR (L/h)	Baldintza	2	113,424	56,712	26,959	0,000
	Egunak	1	0,823	0,823	0,787	0,163
	Baldintza*	2	4,435	2,218	2,119	0,163
	Egunak					
	Totala	5	118,682			

3. Esperimentua

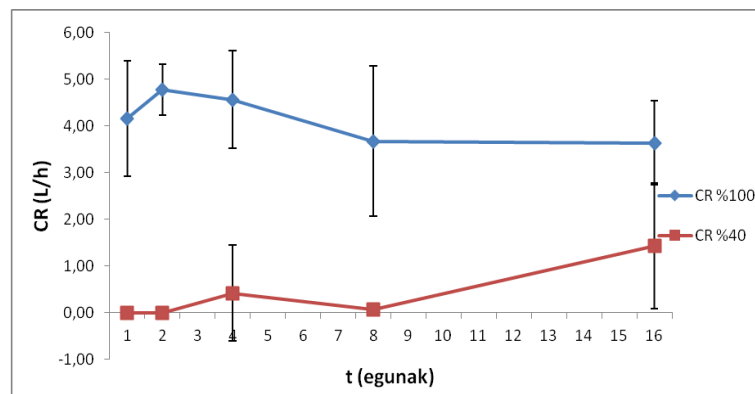
Bigarren esperimentuan ikusi zen aklaratzeko gaitasunaren berreskurapena probatzeko hirugarren esperimentua planteatu zen. Horrez gain, berreskurapen hori aminoazido askeekin edo NPS deitutakoekin erlazioa zuen ala ez konprobatzeko muskuiluen muskulu abduktore eta brankiaren NPSak kalkulatu ziren.

Kasu honetan jarraipen luzeago bat egin zen, aklaramendu tasa eta NPSak neurtu ziren muskuiluak dagokion gazitasunean sartu eta lehenengo, bigarren, laugarren, zortzigarren

eta hamaseigarren egunetara. %70 diluzioan ezberdintasunik aurkitu ez zirenez, esperimentu honetan %100ko eta %40ko gazitasunak erabili ziren.

%100ko muskuiluei dagokionez, 24 ordutan 4,15L/h-ko batezbesteko aklaramendu tasa aurkeztu zuten. 48 ordutan 4,78L/h, 4 egunetan 4,56L/h, 8 egunetan 3,67L/h eta 16 egunetan 3,64L/h.

%40ko gazitasunean aurkitzen ziren muskuiluek, aldiz, lehenengo bi egunetan ez zuten batere aklaratu. 4. egunean bakarria aklaratu zuen 2,50L/h aklaramendu tasa estandarrarekin. 8.egunean bi baino ez zuten aklaratu 0,6 eta 0,7L/h-ko aklaramendu tasak aurkeztuz eta 16.egunean lau muskuilu aklaratu zuten 1,42L/h-ko batezbesteko aklaramendu tasarekin. Berriz, ere ezberdintasun nabariak aurkitu ziren bi gazitasun kontzentrazioen artean, 3.irudian ikus daitekeen moduan.

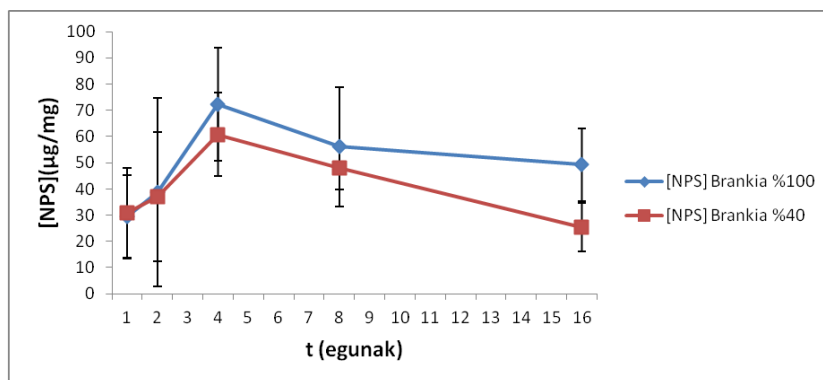


3.irudia. %100 eta %40ko gazitasunean aurkitzen diren muskuiluen batezbesteko iragazte tasak eta desbiderapen estandarrak.

Estatistikoki ezberdintasunak ikusteko faktore bakarreko ANOVA bat egin zen baina Levene proba gainditu ez zenez, neurketa ez parametrikokoak egin ziren. Kruskal-Wallis testean egunek ez zutela eraginik ikusi zen $p=0,984$ izanda. Aldiz, baldintzan ezberdintasunak zeudela ikusi zen $p=0,000$ izanik. Beraz, bi baldintzen artean aklaramendu tasan ezberdintasun argiak zeudela esan daiteke.

Brankiako NPSen neurketari dagokionez, %100ko gazitasuneko muskuiluek, lehenengo egunean batezbestez 29,54 mg aa/mg brankia NPS kontzentrazioa aurkeztu zuten. 2.egunean 38,69mg/mg, 4.egunean 72,40 mg/mg, 8.egunean 56,05mg/mg eta 16.egunean 49,28mg/mg. Beraz, hasieran gora egin zuten, oraindik gazitasunera moldatzen zeudenaren seinale izan daitekeena eta denborarekin behera egin zuten berriz. Hala ere, azkeneko balioa hasierakoa baino handiagoa izaten jarraitu zuen.

%40ko gazitasunean aurkitzen ziren muskuiluetan honako batezbesteko NPS kontzentrazioak aurkitu ziren brankian: 1.egunean 30,75mg/mg, 2.egunean 36,99mg/mg, 4.egunean 60,72mg/mg, 8.egunean 48,09 mg/mg eta 16.egunean 25,45 mg/mg. Orokorrean, %40ko diluzioko muskuiluek NPS kontzentrazio baxuagoak aurkeztu zituzten, eta azken egunetan beherakada bortitzago bat ikus daiteke (4.irudia).



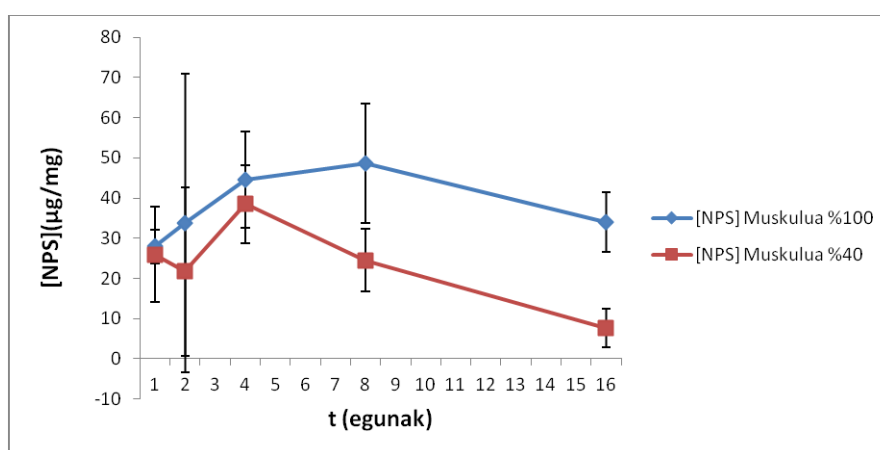
4.Irudia. NPSen kontzentrazioen batezbestekoak eta desbiderapen estandarrak brankian bi gazitasun ezberdinetan.

Estatistikoki aztertzeko, faktore bakarreko ANOVA bat burutu zen. Denborari dagokionez, NPSen kontzentrazioan eragina duela ondorioztatu zuten analisiek ($p=0,000$). Baldintza, aldiz, $p=0,096$ aurkeztu zuen, %95 probabilitatearekin esangarria ez dena. Hala ere, hain balio baxua izanez, esan zitekeen hain ale gutxi izanda eta burututako analisietan praktika gutxi izanda efektua ikusi ez izatea baina ezberdintasunak existitzea bi baldintzen artean. Baldintza eta denbora elkarrekin aztertuta ezberdintasunik ez zeudela ikusi zen ($p=0,583$) Tukey eta Scheffe testak eginez, ikusi zen laugarren egunean aurkitu zirela balio ezberdinenak, batez ere 1., 2. eta 16.eguneekeko.

3. taula. Brankiako NPSen estatistikaren laburpena

Parametroa	Iturria	Askatasun graduak	Karratuen batura	Karratuen media	F	p
[NPS]B	Baldintza	1	1159,929	1159,929	2,883	0,096
	Egunak	4	10138,196	2534,549	6,300	0,000
	Baldintza*	4	1156,737	289,184	0,719	0,583
	Egunak	4	1156,737	289,184	0,719	0,583
	Totala	9	12454,862			

Muskuluari dagokionez, NPSen kontzentrazioak honako hauek izan ziren %100ko gazitasunean zeuden muskuiluetan: 1.egunean 27,99mg/mg, 2.egunean 33,76mg/mg, 4.egunean 44,61mg/mg, 8.egunean 48,70mg/mg eta 16.egunean 34,03 mg/mg. %40ko gazitasuneko muskuiluek beste balio hauek aurkeztu zituzten: 1.egunean 25,91 mg/mg, 2.egunean 21,69mg/mg, 4.egunean 38,54 mg/mg, 8.egunean 24,54 mg/mg eta 16.egunean 7,63 mg/mg.



5.1rudia. Muskuluko NPS kontzentrazioen batezbestekoak eta desbiderapen estandarrak bi gazitasun ezberdinetan.

5. Irudian ikus daitekeenez, muskulua kasuan baldintzen artean ezberdintasun argiagoak zeuden. Hori estatistikoki frogatzeko ANOVA bat egin zen baina Levene proba gaitu egin zenean, neurketa ez parametrikoko egin ziren. Denborak eragina zuen ala ez frogatzeko Kruskal-Wallis testa burutu zen eta $p=0.015$ batekin esan daiteke denborak eragina izan

zuela NPSen kontzentrazioan. Baldintzari dagokionez, Mann-Whitney testa burutu zen eta kasu honetan, baldintzak eragina zuela ikusi zen ($p=0,004$). Beraz bi gazitasunen artean NPSen kontzentrazioa ezberdina izan zen eta neurketa egindako egunak ere eragina izan zuen. Oro har, ikus daitekeen efektua da gazitasun beherapenarekin, aklimatazioan zehar NPSen kontzentrazioak behera egiten duela (%30ko jeitsiera ematen da), aklaratzeko gaitasuna berreskuratzen den aldi berean.

Eztabaida

Lan honetan hasieran planteatu zen hipotesia izan zen gazitasunak aklaramendu tasa eragina zuela eta eragin hori konprobatu da. Egia da, gazitasun aldaketa graduala izanda, ez dela eraginik nabaritu eta beste lan batzuetan konprobatu da aklaramendu tasa ezberdinak lortzen direla gazitasun aldaketa gradual batekin edo talka osmotiko baten ondoren (Resgalla Jr. et al, 2007). Resgalla Jr et al ere ikusi zuten talka osmotiko baten ostean gazitasun oso baxuetan eta oso altuetan aklaramendu tasa inhibitzen zela. Beraz, gazitasun aldaketa bortitz horren ondorioz, gazitasun baxuetan, muskuiluek ez zuten aklaratzeko, izan ere, egoera deseroso horretan lehenengo erantzuna balben itxiera da (McFarland et al, 2013; Resgalla Jr. Et al, 2007, Risgard et al 2013). Jokaera honen bidez animalia kanpo mediotik isolatzen da eta bere barne medioko kontzentrazio aldaketa bortitzak ekiditen ditu. Inguruneko egoera onargarria denean animaliak balbak irekitzen ditu eta kanpo medioa eta barne medioa oreka osmotikoa lortzen dute. Balbak itxita daudenean, prozesu fisiologiko arruntak, esaterako aklaratzeko gaitasuna, inhibitzen dira (McFarland et al, 2013).

Esperimentuei esker ikusi da %70ko gazitasunak ez duela eraginik aklaramendu tasa baina bai muturreko gazitasun bat, %40koa, animaliaaren tolerantzia tarteen mugetan egongo dena. Beste lanetan ere ikusi da aklaramendu tasa gazitasun jaitsierarekin behera egiten duela, batez ere 15psu (gazitasun unitate praktikoak) inguruan, honako esperimentuaren %40aren baliokide bat izan daitekeena (Sarà et al, 2008). Beste esperimentu batzuetan,

Mytilus edulis muskuilua erabiliz, aklaramendu tasaren jaitziera nabaria izan zen gazitasun askoz baxuagoetan (Risgard et al, 2013). Chaparro et al (2008) egindako esperimentuan aldiz, 20psu baino gutxiagoko gazitasunetan aklaratzeari uzten zioten *Crepipatella dilatata* moluskuek. Lan honetan burutu den aklaramendu tasaren estandarizazioa garrantzitsua izan da ere, izan ere, demostratu da muskuilu txikietan gazitasunaren beherapenak efektu handiagoa duela aklaramendu tasaren murrizpenean (Rajesh et al, 2001). Kasu honetan gazitasunaren beherapenak duen efektua ikusi da baina beste lanetan ikertu da gazitasun igoerak ere aklaramendu tasa murriztea eragiten duela (Enriquez Ocaña et al, 2012; Gúzman-Agüero et al, 2013).

Hala ere, nahiz eta gazitasun txikietan aklaramendu tasak behera egin, denborarekin gora egiten duela ikus daiteke, beraz, esan daiteke gazitasun jaitzierak aklaramendu tasa jaisten duela baina esperimentuaren iraupenak gora egitea eragiten duela (Wang et al, 2011).

Esperimentuak aurrera egin ahala aklaratzeko gaitasuna berreskuratzen dela ikusi da, eta horri aklimatazioa deritzo eta aklimatazio hau NPSei esker gertatzen da, bolumenaren erregulazioa baimentzen duena (McFarland et al, 2013; Sadok et al, 1995). NPSak aminoazido askeak dira eta oreka osmotikoa lortzeko balio dute, zelularen bolumena konstante mantentzen den bitartean, kalteak ekidituz. Erregulazio hau aktiboki egiten da, beraz, gastu metabolikoa eragiten du (George eta Damodaran, 1999).

Esperimentu honetan NPSen kontzentrazioa bai brankian bai muskuluan neurtu da. Orain arte egindako esperimentuetan ez da brankietan NPSen neurketa egin baina iragazpena organo honetan gertatzen denez logikoa litzateke zelula hauetan NPSen erregulazioa ere burutzea. Kasu honetan ezberdintasunak %100ko gazitasunean zeuden muskuiluekin konparatuz esangarriak ez direla ikusi da, baina, esangarri izatetik oso gertu geratzen da. Hori dela eta, kontuan hartu behar da erabilitako muskuilu ale kopurua ez dela oso handia eta lan hau egiteko esperientzia ere ez dela handia, beraz, ikertzeko gauza bat izango litzateke, izan ere, baliteke brankietako zeluletan ere NPSen erregulazioa egitea.

Muskuluaren kasuan aldiz, %40ko gazitasunean dauden muskuiluetan NPSen beherapen nabaria ikusi da. Izan ere kanpo medioa diluitzean, barne medioko aminoazido aske hauen kontzentrazioa ere behera egin du, zelulen ur sarrera ekiditeko, zelulen bolumena mantenduz. Kasu honetan efektu hau 8 eta 16 egunen artean ikusi da non muskuiluek substantzia aske hauen %30ko beherapena eragiten dute. George eta Damodaran (1999) NPSen jaitsiera bat ere ikusi zuten estres hiposmotikoaren aurrean. Gainera, NPSen beherapen hori CR-ren berreskurapen partzialarekin bat egiten du, hau da, zortzigarren egunetik aurrera bi prozesuak (CR-ren igoera eta NPSen beherapena) oso nabariak dira. Bestalde, esan daiteke aklimatazioa partziala dela, aklaramendu tasa ez dela guztiz berreskuratzen, NPSen erregulazioa modu osoan eman ez delako. Hau da, NPS kontzentrazioaren erregulazioa nahikoa da balben mugimendua berreskuratzeke eta iragateka prozesua bultzatzeko baina ez aklaramendu tasaren errekuerazio osoa lortzeko. Bestalde, beste lanetan ikusi da, gazitasuna jaistean NPSen kontzentrazioa behera egiten duen moduan, gazitasuna igotzean hauen kontzentrazioa ere gora egiten du, ur irteera ekiditeko (Chandran eta Damodaran, 2000; Roy et al, 2007)

Bibliografia

- ✓ Chandran R. V. & Damodaran R (2000). Oxygen consumption, ammonia excretion and total ninhydrin positive substances in black clam *Villorita cyprinoides* (Pelecypoda) exposed to various salinities. *Indian Journal of Marine Sciences*, 29: 80-82
- ✓ Chaparro O.R., Montiel Y.A. , Segura C.J. , Cubillos V.M. , Thompson R.J. , Navarro J.M. (2008). The effect of salinity on clearance rate in the suspension-feeding estuarine gastropod *Crepidatella dilatata* under natural and controlled conditions. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 76: 861-868

- ✓ Cornet M. (2006) Effects of seawater salinity fluctuations on primary tissue culture from the mussel *Mytilus galloprovincialis* Potential application to the detection of seawater genotoxicity. *Toxicology in Vitro*, 20: 1500–1505
- ✓ Coughlan J (1969) The estimation of filtering rate from the clearance of suspensions. *Marine Biology* 2: 356–358
- ✓ Enriquez-Ocaña L. F., Nieves-Soto M., Piña-Valdez P., Martinez-Cordova L. R. & Medina-Jasso M.A. (2012). Evaluation of the combined effect of temperature and salinity on the filtration, clearance rate and assimilation efficiency of the mangrove oyster *Crassostrea corteziensis* (Hertlein, 1951). *Arch. Biol. Sci.*, 64
- ✓ George P. J. & Damodaran R (1999). The intracellular fluid isosmotic regulation in yellow clam *Sunetta scripta* L. (Mollusca: Bivalvia) acclimated to different salinities. *Indian Journal of Marine Sciences* 28: 83-86
- ✓ Guzmán-Agüero J. E., Nieves-Soto M., Hurtado M. Á., Piña-Valdez P., Garza-Aguirre M. C. (2013) Feeding physiology and scope for growth of the oyster *Crassostrea corteziensis* (Hertlein, 1951) acclimated to different conditions of temperature and salinity. *Aquacult Int* 21:283–297
- ✓ Iglesias J.I.P., Pérez Camacho A., Navarro E., Labarta U., Beiras R., Hawkins A.J.S. & Widdows J. (1996). Microgeographic variability in feeding, absorption, and condition of mussels (*Mytilus galloprovincialis*): A transplant experiment. *Journal of Shellfish Research*, 15: 673-680
- ✓ Kube S., Sokolowski A., Jansen J.M., Schiedek D. (2007). Seasonal variability of free amino acids in two marine bivalves, *Macoma balthica* and *Mytilus spp.*, in relation to environmental and physiological factors. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 1015-1027
- ✓ McFarland K., Donaghy L. & Volety AK. (2013). Effect of acute salinity changes on hemolymph osmolality and clearance rate of the non-native mussel, *Perna viridis*, and the native oyster, *Crassostrea virginica*, in Southwest Florida. *Aquatic Invasions* 3: 299–310

- ✓ McLeod R. J., Wing S. R. (2008). Influence of an altered salinity regime on the population structure of two infaunal bivalve species. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 78: 529-540
- ✓ Rajesh K V, Mohamed K S & Kripa V (2001). Influence of algal cell concentration, salinity and body size on the filtration and ingestion rates of cultivable Indian bivalves. *Indian Journal of Marine Sciences*, 30: 87-92
- ✓ Resgalla Jr. C, de Souza Brasil E. & Salomão LC. (2007) The Effect of Temperature and Salinity on the Physiological Rates of the Mussel *Perna perna* (Linnaeus 1758) *Brazilian archives of biology and technology*, 50, 3zbkia: 543-556 orri.
- ✓ Riisgard H. U., Lüskow F., Pleissner D., Lundgreen K., López M.Á.P. (2013). Effect of salinity on filtration rates of mussels *Mytilus edulis* with special emphasis on dwarfed mussels from the low-saline Central Baltic Sea. *Helgol Mar Res*, 67: 591–598
- ✓ Roy L. A., Davis D. A., Saoud I. P., Henry R. P. (2007). Branchial carbonic anhydrase activity and ninhydrin positive substances in the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, acclimated to low and high salinities. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 404–411
- ✓ Ruiz J. L. & Souza M.M (2008). Osmotic stress and muscle tissue volume response of a freshwater bivalve. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 151: 399–406
- ✓ Sadok S., Uglowa R. and Haswellb S. J. (1995). Determination of Ninhydrin Positive Substances in Sea-water and Hemolymph. *Analyst*
- ✓ Sadok S., Uglow R. F., Haswellb S. J. (1997). Haemolymph and mantle fluid ammonia and ninhydrin positive substances variations in salinity-challenged mussels (*Mytilus edulis* L.). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 212
- ✓ Sarà G., Romano C., Widdows J. , Staff F.J. (2008). Effect of salinity and temperature on feeding physiology and scope for growth of an invasive species (*Brachidontes pharaonis* - Mollusca: Bivalvia) within the Mediterranean sea. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 363: 130–136.

- ✓ Wang Y., Hu M., Hing Wong W., Shin P. K.S & Cheung S.G. (2011). The combined effects of oxygen availability and salinity on physiological responses and scope for growth in the green-lipped mussel *Perna viridis*. *Marine Pollution Bulletin* 63: 255-261
- ✓ Shumway S.E., Gabbott P.A., Arthur Youngson (1977) The effect of fluctuating salinity on the concentrations of free amino acids and ninhydrin positive substances in the adductor muscles of eight species of bivalve mollusks.