

Gradu Amaierako Lana

Biokimika eta Biologia Molekularreko Gradua

Dieta bidez zilar eta kuprez kutsaturiko *Crassostrea gigas* ostraren azterketa histologikoa eta histokimikoa

Egilea/Autor/a:

Lorea Velasco Carneros

Zuzendaria/Director/a:

Beñat Zaldibar Aramburu



AURKIBIDEA

1. SARRERA	
1.1. OSTRAK	3
1.1.1. DIGESTIO-GURUINA	3-4
1.2. METALAK INGURUMENEAN	4
1.2.1. METALEN BANAKETA BIBALBIOETAN	4
2. MATERIAL ETA METODOAK	
2.1.OSTRAK ESKURATU	5
2.2. ALGAK KUTSATU ETA OSTRAK ELIKATU	5
2.3. DISEKZIOAK ETA LAGINEN PROZESAMENDUA	5-7
2.4.ARGAZKIAK ATERA ETA ANALIZATU	7-8
2.5. ANALISI ESTADISTIKOA	8
3. EMAITZAK	
3.1.ZILAR HAUSPEAKIN BELTZEN KUANTIFIKAZIOA	8-9
3.2. EHUN KONEKTIBO/ DIGESTIO EHUN RATIOA	9-10
4. EZTABAIDA	11-14
5. BIBLIOGRAFIA	14-15

1. SARRERA

Bibalbioek eta haien artean ostrek, itsasoan eta kostaldeko uretan dauden kutsatzaileak metatzeko gaitasuna dute. Ingurumenean agertzen diren kutsatzaile garrantzitsuenen artean, metalak daude eta bibalbioak hauek metatzeko eta beraien presentziaren aurrean erantzuteko gai direnez ¹, itsas ingurumeneko osasunaren behale aproposak dira ^{2,3}.

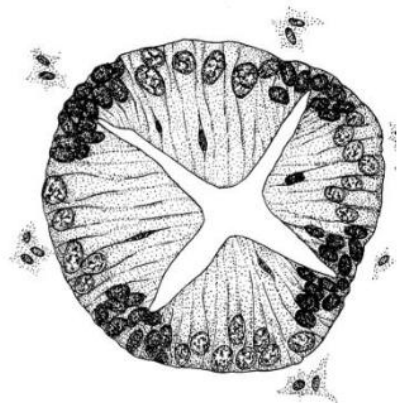
1.1. OSTRAK

Ikerketa honetan erabilitako espeziea *Crassostrea gigas* da. Ostra hau Ozeano Barean jatorria du, nahiz eta gaur egun munduko zonalde desberdinetan aurki daitekeen ⁴. Ostrak kostalde eta estuarioetako espezie gakoa izateaz gain, komertzialki ere garrantzitsuak dira. Adibidez Frantzia ostra komertzialen hazkuntza oso garrantzitsua da, urtero 116000 tona ekoizten direlarik ⁵, eta haien inpaktu ekonomikoari dagokionez, Frantziako merkataritzan hauen produkzioari esker urtero 260 milioi euro irabazten dira ⁶.

Ostretan, organismo iragazleak izanik, elikagaiak urarekin batera zakatzetatik sartzen dira, eta palpo labialek bideratuta eta esofago labur bat igaro ondoren elikagaien digestioa nagusiki digestio-guruineko dibertikuluetan emango da ⁷.

1.1.1. DIGESTIO-GURUINA

Janariaren asimilazioa eta digestio intrazelularra digestio-guruinean ematen da, baita digestio estazelularrean parte hartzen duten entzimen sintesia ⁸. Digestio-guruina adarkatzen diren eta urdailarekin konektatuak dauden dibertikula desberdinez osatua dago, eta ehun konektiboz inguratua dago. Zeharkako mozketa batean tubuluaren lumena ikus daiteke, normalean gurutze baten itxurakoa (**1. Irudia**). Lumeneko gurutzearen erpinetan normalean zelula gazteen kriptak agertzen dira, nukleo handi eta trinkodunekin eta gutxi definitutako mugekin, eta zelula gazte hauek askatzen diren zelula zaharrak ordezkatzeko dituzte. Sistema immuneko zelulak oso ugariak dira bai digestio-zelulen artean baita tubuluak inguratzen dituen ehun konektiboan ⁹.



1. Irudia. Ostra baten digestio-tubulu osasuntsua. Ikusten da nola epitelioak izar itxurako lumena eratzen duen. Galtsoff, 1964, moldatua.

Digestio-guruina elikagaien metaketa eta metabolismo gune nagusia izanik, ostrak estres baten aurrean daudenean digestio-guruinean era desberdinetako alterazioak jasaten dituzte ¹⁰. Besteak beste, oso arrunta da digestio-guruina osatzen duten tubuluaren epiteliaren altueraren murrizpena (atrofia) edota digestio-guruinean dauden zelulen (liseri-zelulak eta zelula basofilikoak) proportzioaren aldaketa ¹¹. Horregatik, digestio-guruineko tubuluaren epiteliaren lodiera molusku bibalbioen osasun egoera determinatzeko sarritan erabiltzen den parametroa da ¹². Burutuko den esperimentuan arreta handia jarriko da parametro honetan, besteak beste ezaguna delako atrofia eragiten duten faktoreen artean aipagarrienak elikagai gabezia edota kutsatzaileekiko esposizioa direla ¹³.

1.2. METALAK INGURUMENEAN

Gaur egun, prozesu industrialen bidez besteak beste metal astunak itsasora isurtzen dira, hau kutsatuz ¹⁴. Metal astun gisa kontsidera daiteke dentsitate erlatibo altuko eta kontzentrazio baxuetan toxikoa den edozein elementu metaliko. Metalen artean arriskutsuenak dira hauek, ezin direlako hain kaltegarriak ez diren produktuetara eraldatu eta gainera, milaka urtez mantendu daitezkeelako ingurunean ¹⁵. Ikerketa honetan zilarra (Ag) eta kuprean (Cu) zentratu gara, izan ere hauek Bizkaiko Golkoko zenbait tokitan maila esanguratsuetan agertzen dira ¹⁶.

1.2.1. METALEN BANAKETA BIBALBIOETAN

Bibalbioetan metalen mobilizazioa ehun desberdinetan sarrera bidearen arabera eta metal motaren arabera aldakorra da. Partikulatutako metalen gehiengoa elikagaiekin batera barneratu, batez ere hemozitoen bidez garraiatu, eta azkenean digestio zeluletara heltzen da, non janaria digeritua izango den. Metalen parte bat zelula arreetan eta beste bat mantuko zelula epitelialetan metatuko da, baina nagusiki metalak hemozitoetan eta digestio zeluletan gordeko dira ¹⁷.

Metalak kanporatzeko bide desberdinak daude. Alde batetik, hemozitoen bidez giltzurrunera garraiatuko dira eta hondakinekin batera kanporatuko dira, gertuaren bidez. Beste aukera bat digestio-zeluletako lisosomekin kanporatzea da, gorotzen bidez ¹⁷.

2. MATERIAL ETA METODOAK

2.1. OSTRAK ESKURATU

Ostrak urtarrilak 7an erosi ziren San Vicente de la Barqueran (Ostranor S.L), eta esperimientua hasi aurretik girotzen utzi ziren astebetez (urtarrilak 14erarte) esperimienturako erabiliko zen ur berdinean eta elikatu gabe, digestio-traktua husteko asmoz. Gero 8 ontzitan (4 tratamendu eta 2 erreplika tratamendu bakoitzeko) jarri ziren **1. Taulan** agertzen diren etiketekin.

2.2. ALGAK KUTSATU ETA OSTRAK ELIKATU

Esperimientua hasi aurretik *Isochrysis galbana* algak kultibatu behar izan ziren alga gelan (18-20 °C-tan dagoena), eta ondoren hauek ⁶³Cu edota ¹⁰⁷Ag metal isotopoekin kutsatu ziren. Algak ⁶³Cu eta ¹⁰⁷Ag disoluzioekin kutsatzeko 17-18 °C-tan dagoen gela bat erabili zen. Bertan kristalezko botiletan algak 24 ordutan egon ziren kutsatzailea zeraman uretan.

1. Taula. Ostrak elikatzeko erabiliko diren algak kutsatzeko erabilitako metal kontzentrazioak.			
500 ng ¹⁰⁷ Ag/L	8600 ng ⁶³ Cu/L	500 ng ¹⁰⁷ Ag/L + 8600 ng ⁶³ Cu/L	Kontrolak (Kutsatu gabe)

Kutsatutako algak zentrifugatu ziren (6 minutuz 4000 bira minututan). Gainjalkina kendu eta itsasoko ur garbitan birsuspenditu eta gero, algak ostrak elikatzeko erabili ziren. Horretarako, 20 h-tako esposizioak egin ziren, hau da, egunero ostrak 4 orduz ur garbian egon ziren eta gainontzeko 20 orduak aldeztu aurretik kutsatutako eta birsuspenditutako algekin elikatu ziren.

2.3. DISEKZIOAK ETA LAGINEN PROZESAMENDUA

Histologia egiteko tratamenduko 10 ostra hartu eta 0 egunean (kutsatzen hasi aurretik), 7. egunean, 14.ean eta 21.ean ostra bakoitzeko, organo guztiak hartzen zituen 5 mm-tako zehar ebaki bat egin zen. Ebakiak formalinan utzi ziren 24 orduz eta alkoholera pasa ziren. Ondoren parafina blokeak egiteko prozesamendua burutu zen (**2. Taula**).

2. Taula. Parafina blokeak sortzeko pausuak. Lehenengo deshidratatu eta gero parafinan inkluitu.

PAUSUA	DENBORA
70% Etanola	1 ordu
96% Etanola	1 ordu
96% Etanola	1 ordu
Etanol Absolutua	1 ordu
Etanol Absolutua	1 ordu
Xilol:Etanol absolutua 1:1 diluzioa	1 ordu
Xilol	1 ordu
Xilol	1 ordu
Parafina (55-60°C)	2 ordu
Parafina (55-60°C)	2 ordu
Parafina (55-60°C)	2 ordu

Mikroskopioan ikusi ahal izateko, ostren ebakiak mikrotomoan moztu egin ziren, ostra bakoitzeko bi porta egin zirelarik (bat hematoxilina-eosina tindaketa egiteko eta bestea autometalografia tindaketa histokimikorako).

Horretarako, banan banan parafina bloke bat mikrotomoan jarri, blokea desbastatu (laginera heldu arte) eta kontu handiz 5 µm-tako ebakia lotu, zeina 40 °C-tan zegoen ur bainuan zabaltzen zen. Azkenik, porta batean albumina jarri eta porta bakoitzeko ostra berdinarekin bi ebaki arrantzatu ziren.

Portak estufan (37 °C-tan) lehortzen utzi ziren 24 orduz, eta gero estufatik atera eta giro tenperaturan gorde ziren tindatuak izan arte.

Esan bezala ostra bakoitzeko bi porta egin ziren, bakoitzarekin prozesamendu desberdin bat egiteko, tindaketa mota desberdin bat.

Autometalografia egin aurretik laginak desparafinatu eta hidratatu behar izan ziren. Horretarako, hematoxilina-eosina prozesamenduan jarraitu beharreko lehen urratsak manualki egin ziren (**3. Taula**).

3. Taula. Blokeen desparafinazioa eta hidratazioa buruteko urratsak.

PAUSUA	DENBORA
Xilol	10 min
Xilol	10 min
Etanol Absolutua	2 min
Etanol Absolutua	2 min
96% Etanola	2 min
96% Etanola	2 min
70% Etanola	2 min
H ₂ O _d	5 min

Prozesu hau egin ondoren, laginak estufan lehortzen utzi behar izan ziren 24 orduz 37 °C-tan, eta hurrengo egunean tindaketa burutu zen. Tindaketa egiteko Silver

Enhancement Kit for LM and EM (Agar Scientific, Erresuma Batua) kita erabili zen ¹⁸, zeinak bi errektibo dituen (*initiator* eta *enhancer*). Saiodi batean bi errektiboak proportzio berdinean nahastu eta porta bakoitzean zeuden bi ebakiei tanta bana gehitu zitzairen. Porta hauek kamara heze batean utzi ziren ilunpean 15 minutuz, erreakzioa gerta zedin, eta azkenik, tanta garbitu eta porta bakoitzari estalkiak jarri zitzaion gelatinadun glizerina erabiliz. Honi esker metalak zilarrezko hauspeakin beltz (ZHB) bezala ikusiko dira.

Hematoxilina-eosina tindaketa egiteko, prozesua modu automatikoan burutzen duen Leica Autostainer XL (Leica, Alemania) makina tindatzailea erabili zen, manualki egin zitekeen prozesua errepikakorragoa bilakatuz eta azkarrago burutuz (**4. Taula**).

4. Taula. Hematoxilina-eosina tindaketan jarraitutako pausuak.

PAUSUA	DENBORA
Xilol	10 min
Xilol	10 min
Etanol Absolutua	2 min
Etanol Absolutua	2 min
96% Etanola	2 min
96% Etanola	2 min
70% Etanola	2 min
H ₂ O _d	5 min
Hematoxilina	4 min
Alkohol Azidoa	10 seg
H ₂ O	5 min
Litio Karbonatoa	10 seg
H ₂ O	1 min
Eosina	1:30 min
H ₂ O	1 seg
H ₂ O	2 min
70% Etanola	2 min
96% Etanola	2 min
Etanol Absolutua	2 min
Etanol Absolutua	2 min
Xilol	5 min
Xilol	5 min

Tindaketarekin bukatu ondoren, portak aurrekoarekin konektatuta dagoen hurrengo aparatua (Leica CV 5030 (Leica, Alemania)) bideratuak izan ziren automatikoki, bigarren honek portei estalkia jarri zielarik DPX erabiliz.

2.4. ARGAZKIAK ATERA ETA ANALIZATU

Tindatutako lagin guztiak Nikon Eclipse TI-S (Nikon, Tokio, Japonia) mikroskopio optikoarekin behatu ziren, eta porta bakoitzeko bi argazki atera ziren 200-eko

handipeneko objektiboarekin. Bai autometalografiako laginetan baita hematoxilina-eosinakoetan digestio tubuluaren argazkiak ateratu ziren.

Behin argazki guztiak aterata, argazkiak Image J programaren bidez analizatu ziren. Alde batetik, hematoxilina-eosina tindaketan ehun konektibo/ digestio ehun erlazioa behatu zen, eta bestetik, autometalografiakoetan ZHB-ek betetzen zuten azalera erlatiboa neurtu zen.

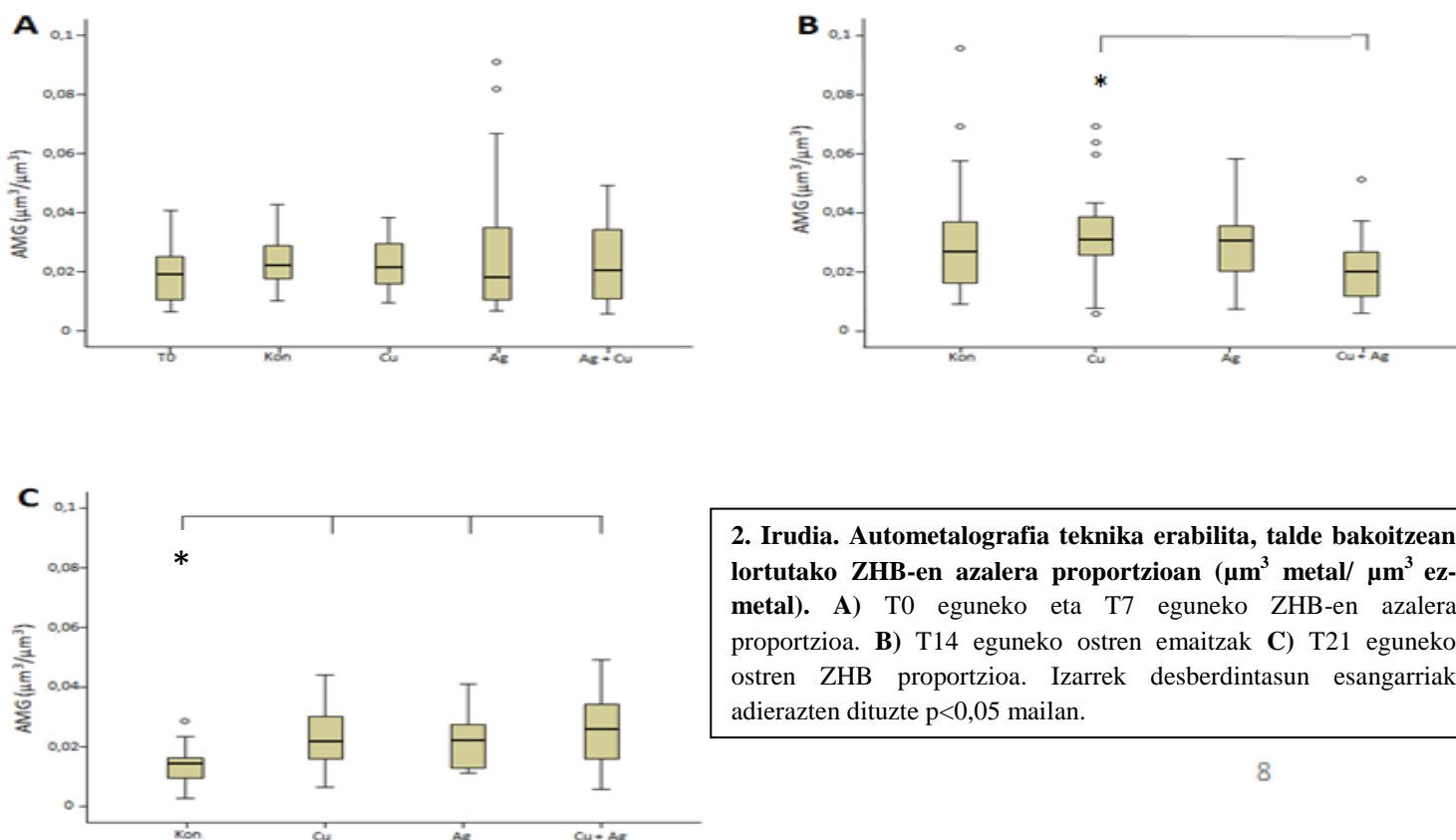
2.9. ANALISI ESTADISTIKOA

Lortutako datuak esangarriak ziren ikusteko lehendabizi homogenizitate proba egin zen, Levene estatistikoa erabiliz. Homogeneok zirenekin ANOVA egin zen, proba honetan 0,05 baino txikiagoak ziren p balioak ontzat hartuz. ANOVA proba gaitzuta eta, Duncan proba burutu zen, desberdintasunak estatistikoki esangarriak ziren determinatuz. Autometalografiako homogenizitate proba egin aurretik datuak normalizatu ziren logaritmoak aplikatuz.

3. EMAITZAK

3.1. ZILAR HAUSPEAKIN BELTZEN KUANTIFIKAZIOA

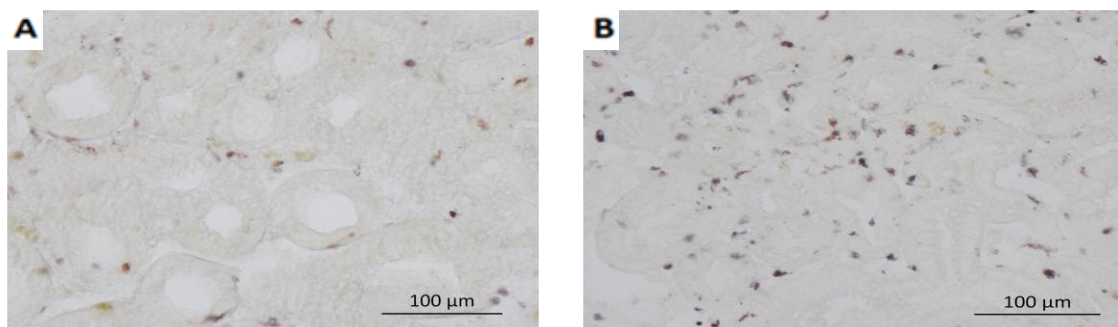
Digestio-guruinean emandako metalen metaketari dagokionez, **2.A. Irudian** ikus daiteke T0 eta zazpigarren egunean emaitzak nahiko antzekoak direla, hau da, digestio-guruinean emandako metalen metaketa ez da esangarriki aldatzen taldeen artean.



2. Irudia. Autometalografia teknika erabilita, talde bakoitzean lortutako ZHB-en azalera proportzioan (μm^3 metal/ μm^3 ez-metal). **A)** T0 eguneko eta T7 eguneko ZHB-en azalera proportzioa. **B)** T14 eguneko ostren emaitzak **C)** T21 eguneko ostren ZHB proportzioa. Izarrek desberdintasun esangarriak adierazten dituzte $p < 0,05$ mailan.

Hamalagarren eguneko taldeak konparatzean (**2.B. Irudia**) desberdintasun esangarri bat behatzen da Cu eta Cu + Ag taldeen artean. Kuprearen taldekoak kupre + zilarrekoekin konparatuz zilar hauspeakin beltzen proportzio handiagoa erakusten dute.

21. eguneko azterketan (**2.C. Irudia**) estatistikoki esanguratsuak diren emaitzak lortu dira baita. Kontrola eta beste taldeen artean dauden desberdintasunak esangarriak dira, metalekin kutsatuak daudenak ZHB maila altuagoak dituzte digestio-guruinean.



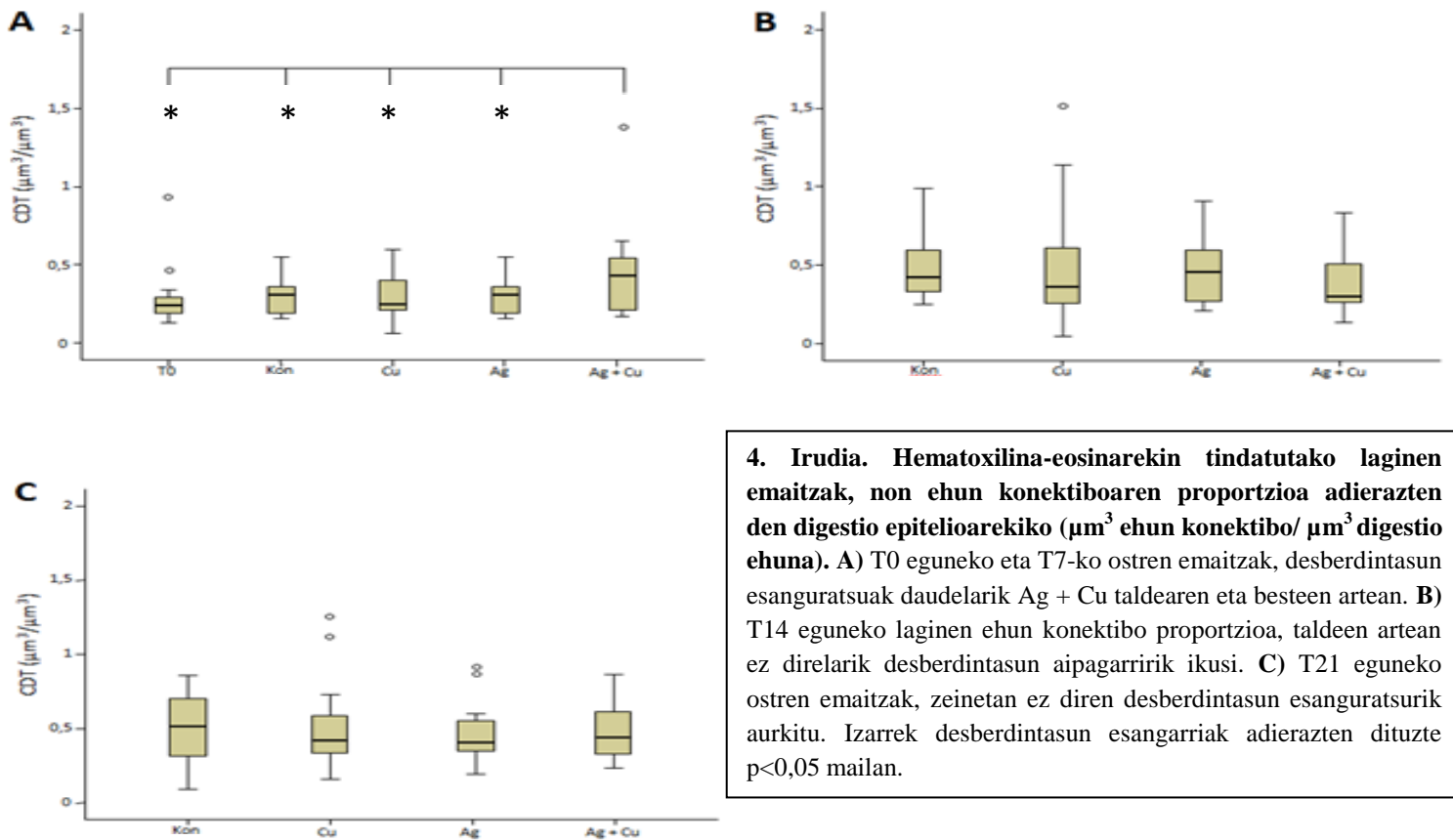
3. Irudia. Autometalografiarekin tindatutako bi lagin desberdinen mikroskopio optikoko argazkiak. Ikusi metalak zilarrezko hauspeakin beltz bezala azaltzen direla A) T0 taldeko ostra baten tubuluak, metal metaketa ez da oso handia. B) T21 eguneko Ag + Cu taldeko argazkia, non metal metaketa askoz nabariagoa den.

3.2. EHUN KONEKTIBOA/ DIGESTIO EHUNA RATIOA

Hematoxilina-eosinarekin tindatutako laginekin ehun konektibo/ ehun digestibo proportzioa aztertu da (**4. Irudia**). Honetan ere T0-a zazpigarren eguneko taldeekin batera adierazi da (**4.A. Irudia**). Zilarra + kupre taldearen ehun konektibo proportzioa besteekin konparatuz handiagoa eta estatistikoki esangarria da 7. egunean. Horretaz gain, ikus daiteke nola T0 egunekoekin alderatuz zazpigarren eguneko talde guztiek (kontrola barne) ehun konektibo gehiago duten proportzioan, nahiz eta hau estatistikoki esangarria ez izan.

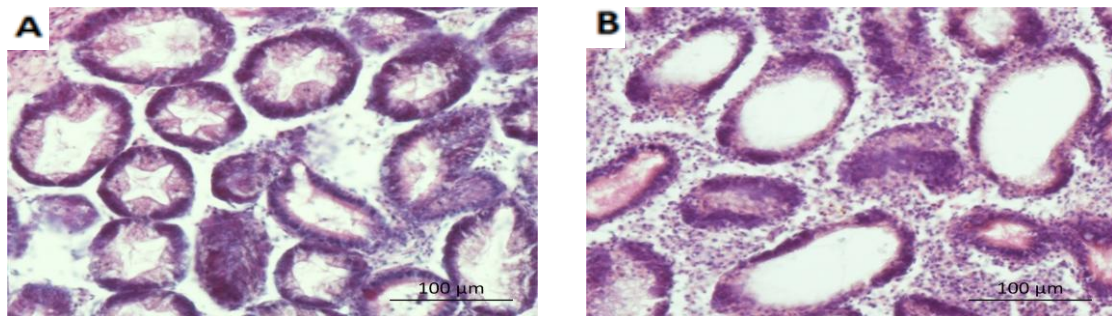
Hamalagarren eguneko taldeak behatuta (**4.B. Irudia**) ez da desberdintasun esangarririk ikusten eta talde desberdinen arteko emaitzak antzekoak dira. Zazpigarren egunekoekin konparatuz (**4.A. Irudia**) hauek ehun konektibo proportzio handiagoa dute orokorrean.

Azkenik, hogeita batgarren eguneko taldeen arteko konparaketan (**4.C. Irudia**) ez dago estatistikoki esangarria den desberdintasunik. Hala ere, ikusten da nola kuprearen



taldean indibiduo batzuk batzuek bestekotik asko aldentzen diren (erlatiboki ehun konektibo asko dute), baita zilarraren taldean ere (baina honetan balioak ez dira aurrekoan bezain altuak).

Interesgarria da ikustea indibidualki emandako erantzunak. Zazpigarren egunean Ag + Cu taldean indibiduo batek ehun konektibo proportzio oso altua du, eta hamalagarren egunean Cu taldean ere populazio gehienetik asko aldentzen den indibiduo bat dago.



5. Irudia. Hematoxilina-eosinarekin tindatutako bi laginen mikroskopio optikoko irudiak. A) T7-ko Ag taldeko ostra baten tubuluak, azalera gehiago betetzen dute eta epitelio altuagoak dituzte. B) T7 eguneko Ag + Cu taldeko argazkia, non ehun konektibo proportzioa handiagoa den.

4. EZTABAIDA

Esperimentu honetan, ingurumenean agertzen diren kontzentrazioen mailak erabili nahi izan dira, batetik lan adierazgarriagoa egiteko asmoz eta bestetik esposizioa eta gero algak bizirik jarraitzeko, beraz algak kutsatzeko erabilitako metal kontzentrazioak ingurumen mailan aurkitu daitezkeen antzekoak izan ziren (**1. Taula**). Hori dela eta posible da algek metalen frakzio bat soilik bereganatu izana eta beraz, hauek jan zituzten ostretara metal gutxi heldu izana. Honen ondorioz, metalen metaketa esangarriak 21. egunean ikusi ziren gehienbat, beraz esperimentu luzeagoak egin beharko lirateke, lortutako igoerak ez baitziren oso nabariak izan. Beste lan batzuetan dosi altuagoak erabili izan dira algak kutsatzeko, ingurumenekoetatik gehiago aldenduz, emaitza estatistikoki esangarriagoak lortuz ³.

Metalen detekzio histokimikoari dagokionez hauen banaketa denboran zehar aldatzen zela ikusi zen. T0-an metalen seinalea hemozitoetan kokatzen zen batez ere, baina denbora aurrera joan ahala hemozito kopurua altuagoa izan zen eta 21. egunean digestio epitelioan ere metalen metaketa behatu zen. Bibalbioek hemozitoetan hemozianina pigmentua dute (kupretan aberatsa dena) eta beraz normala da hemozitoetan metala aurkitzea, gainera bibalbioetan hemozitoek metalak ehun batetik bestera garraiatzeko sistema garrantzitsuena osatzen dute ¹⁹. Hemozitoak metalak metatzeko eta digestio-guruinetik giltzurrunera garraiatzeko sistema gisa kontsideratu daitezke, eta beraz metalen presentzian hauen kopurua emendatzen da ²⁰.

Hamalagarren egunean kuprearen taldean hauspeakin beltzen proportzioa Cu + Ag taldearekin alderatuz handiagoa zela ikusi zen. Bi metalen aurrean erantzuna desberdina izan zen, eta ziurrenik hori lotuta egon daiteke haien funtzio eta toxizitatearekin. Izan ere, kuprea metal esentziala da eta zilarra berriz ez, eta horrek garrantzia izan dezake metalen akumulazio gaitasunean ²¹. Esentzialak diren metalak gordetzeko mekanismoak efizienteagoak dira, izan ere, metal horiek gordetzea egokia izan daiteke, beste momentu batean erabiliak izan daitezkeen ²². Ondorioz, beste ikerketa batzuetan behatu den bezala, Ag bezalako metal ez-esentzialen metaketa digestio zeluletan txikia da, batez ere hemozitoetan bahituta geratzen da, kanporatua izateko ²³. Metal ez-esentzialak kanporatu aurretik giltzurrunetik pasatzen dira ondoren askatuak izateko ¹⁷. Posible da

ikerlan honetan Cu + Ag taldean metal gehiago heldu izana digestio-guruinera, eta esposizio altuago honen ondorioz giltzurruneko kanporaketa bidea talde honetan azkarrago aktibatu izana. Hau horrela balitz, Cu + Ag taldeko giltzurrunean metal metaketa handiagoa esperoko litzateke, askapen bidean. Lan honetan digestio-guruinean bakarrik jarri da arreta, bertako metalen metaketa bakarrik behatu izan da, baina interesgarria litzateke giltzurruneko metalen metaketa ere aztertzea.

Hogeita batgarren egunean, estatistikoki esanguratsua den desberdintasuna ikusi zen kontrolaren eta beste taldeen artean, kontrolean metal gutxiago agertzen zelarik. Ziurrenik aurretik aipatutako kanporaketa mekanismoak saturatuak egon zitezkeen eta ondorioz metal gehiago metatu zen digestio-guruinean. Izan ere, digestio zeluletan janaririk zuzenean datozen metalak zein hemozitoetan daudenak metatzen dira ²⁴.

Autometalografiaren bitartez ezin dira metal guztiak detektatu, soilik modu askean daudenak ²⁵. Esperimentu honetan digestio-guruinean metatutako metaletan jarri zen arreta, baina metalotioneinei estuki lotuta dauden metalak ezin izan ziren detektatu ¹⁷. Analisi kimikoen bitartez egindako neurketek erakutsi dute 14 eta 21. egunetan Ag eta Cu metaketa txiki bat gertatzen dela digestio-guruinean, seguruenik frakzio garrantzitsu bat metalotioneinei lotuta dagoena.

Ehun konektibo/ digestio epitelio proportzioa bibalbioen digestio-guruinak duen osotasun estrukturala ebaluatzeko baliagarria den neurketa bat da ²⁶. Ikerlan honetako emaitzei erreparaturaz, zazpigarren eguneko Cu + Ag taldeak egun horretako besteekin alderatuz ehun konektibo proportzio altuagoa zuela ikusi zen, beraz metaleen nahasketak digestio-epitelioaren andeakuntza eragin zuen zazpigarren egunean. Hamalau eta hogeita batgarren egunetan berriz, Cu + Ag taldea besteen mailara bueltatu zen, hau da, ez zen desberdintasun esangarririk agertzen talde honen eta besteen artean (kontrola barne).

Zazpigarren eguneko Cu + Ag taldean ehun konektibo gehiago egotearen arrazoia ziurrenik metalen presentziak eragindako kaltea da, metalen metaketak zenbait zelulen estresa (eraldaketa metabolikoak, heriotza zelularra...) eta ondorioz digestio-epitelioaren atzerapena eragingo luke ¹⁰. Hamalau eta hogeita batgarren egunetan desberdintasun hori ez ikustearen arrazoi nagusia izan daiteke ostrek eraenketa

mekanismoak martxan jartzen dituztela metalen esposizioari aurre egiteko, immunitate sistemaren aktibazioa ematen dela estresari aurre egiteko. Izan ere, badaude ikerketak zeintzuetan ikusi den baldintza desfaboragarrien aurrean, hala nola temperatura altuak, pH baxua edo zenbait metalen presentzia, ostren immunitate sistema aktibatzen dela ²⁷. Zenbait taldetan behatutako aldakortasun handia lotuta egon daiteke zenbait indibiduotan eman daitezkeen immunitate sistemaren defizientziekin, eraturako kaltea bere taldekideena baino handiagoa izango delarik.

Beste egunetan desberdintasun esangarririk ez aurkitzea, talde esperimental guztiek estres puntu bat izatearekin lotuta egon daiteke. Agian parasittoa den organismo bat zuten edota erabilitako ostren dentsitatea handiegia izan zen haien garapen optimorako.

Lehenago burututako esperimentuetan algak kutsatu beharrean ostrak ur kutsatuan hazi ziren zuzenean ²⁸. Emaitzetan ikusi zen ehun konektibo/ digestio ehun proportzioa ez zela aldatzen 28. egunerarte, non ehun konektiboaren igoera bat behatzen zen. Hori jakinda eta kontuan hartuta algen bidezko kutsaduran ostrek zazpigarren egunean bakarrik adierazi zutela CTD aldaketa esangarria, argi dago metalen sarrera bideak eragina duela ostrengan eragiten duen efektuan ¹⁷.

Bi esposizio motak konparatzerakoan uretan disolbatuak daudenean efektu toxikoa geldoagoa eta progresiboa dela dirudi. Horrela izatekotan bat-bateko aldaketa handirik ematen ez denez defentsa mekanismoak ez dira berehala pizten eta ondorioz metalak gutxika metatuz joago dira, azkenean ehunak kaltetu arte. Metalak janariarekin batera doazenean berriz, digeritzean metal asko askatuko da eta agian bat-bateko aldaketa nabari horri aurre egiteko defentsa mekanismoak piztuko dira, hemozitoen aktibazioa piztuz besteak beste ²⁹. Honek azalduko luke alga kutsatuekin lan egitean zazpigarren egunean ehun mailan eragina ikusi izana baina geroago ez, ostrak bat-bateko metal askapen bati aurre egiteko mekanismoa martxan jartzeko gai izan direlako. Metalak disolbatuak daudenean berriz immunitate sistemarentzat kontzentrazio txikiak dira detektatzeko eta beraz eraenketa mekanismoak martxan jartzeko, ondorioz denbora luzera eraginak ikusten hasiko dira ehun mailan.

Lan honetatik nagusiki ondorioztatu daiteke metalen distribuzioa aldatzen dela denboran zehar eta kontzentrazioaren arabera. Hasieran hemozitoak gai dira metal horiek bereganatzeko baina kontzentrazioa igo ahala digestio ehunean (lisosometan

batez ere) metatzen joango dira, digestio-guruinean alterazioak eraginez ³⁰. Honetaz gain ikusi da ostrak gai direla toxikotasun mailei aurre egiteko, lehenengo esposizioek eragin handiagoa izan dute baina denborarekin metalen bat-bateko askapenak ez die kalte nabaririk eragin, behintzat esperimendu hauek iraun duten bitartean.

Planteatutako ideiak egiazkoak diren ikusteko etorkizunean esperimendu gehiago egitea proposatzen da, non alde batetik, laginak zazpigarren eguna baino lehenago hartuz lehenengo astean gertatzen dena ikusiko litzateke, eta gainera esperimendua luzatu beharko litzateke, esposizio-denbora luzeetan ostrek gero eta kalte gehiago izatea esperoko litzatekeelarik (CTD proportzioan aldaketa gehiago behatuz).

Bestalde, eraenketa mekanismoak ezagutzeko asmoz ere zenbait esperimendu burutu daitezke. Gorotzetan eta gernuan askatutako metalak neurtu edo bestelako ehun eta egitura batzuetan arreta jarri besteak beste.

5. BIBLIOGRAFIA

1. Goldberg, E. D. The Mussel Watch concept. *Environ. Monit. Assess.* **7**, 91–103 (1986).
2. Ortiz-Zarragoitia, M., Garmendia, L., Barbero, M. C., Serrano, T., Marigómez, I. & Cajaraville, M. P. Effects of the fuel oil spilled by the Prestige tanker on reproduction parameters of wild mussel populations. *J. Environ. Monit.* **13**, 84–94 (2011).
3. Amiard-triquet, C., Berthet, B., Joux, L. & Perrein-ettajani, H. Significance of Physicochemical Forms of Storage in Microalgae in Predicting Copper Transfer to Filter-Feeding Oysters (*Crassostrea gigas*). 1–7 (2006). doi:10.1002/tox
4. Wrangé, A. L., Valero, J., Harketstad, L. S., Strand, Ø., Lindegarh, S., Christensen, H. T., Dolmer, P., Kristensen, P. S. & Mortensen, S. Massive settlements of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, in Scandinavia. *Biol. Invasions* **12**, 1145–1152 (2010).
5. Bragigand, V. & Berthet, B. Estimates of trace metal bioavailability to humans ingesting contaminated oysters. **42**, 1893–1902 (2004).
6. Girard, S. French Marine Economic Data 2009. *Quae ed*, 128 pp. (2010)
7. Bayne, B. L., Hawkins, A. J. S. & Navarro, E. Feeding and digestion by the mussel *Mytilus edulis* L. (Bivalvia: Mollusca) in mixtures of silt and algal cells at low concentrations. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* **111**, 1–22 (1987).
8. Zaldibar, B., Rodrigues, A., Lopes, M., Amaral, A., Marigómez, I. & Soto, M. Freshwater molluscs from volcanic areas as model organisms to assess adaptation to metal chronic pollution. *Sci. Total Environ.* **371**, 168–175 (2006).
9. Galtsoff, P.S. The American oyster, *Crassostrea virginica* Gmelin. Fishery Bulletin, v. 64. United States Government Printing Office, Washington, D. C.480 pp. (1964).
10. Garmendia, L., Soto, M., Ortiz-Zarragoitia, M., Orbea, A., Cajaraville, M. P. & Marigómez, I. Application of a battery of biomarkers in mussel digestive gland to assess long-term effects of the Prestige oil spill in Galicia and Bay of Biscay: correlation and multivariate analysis. *J. Environ. Monit.* **13**, 933–942 (2011).
11. Zaldibar, B., Cancio, I. & Marigómez, I. Reversible alterations in epithelial cell turnover in digestive gland of winkles (*Littorina littorea*) exposed to cadmium and their implications for biomarker measurements. *Aquat. Toxicol.* **81**, 183–196 (2007).
12. Cajaraville, M. P., Garmendia, L., Orbea, A., Werding, R., Gómez-Mendikute, A., Izagirre, U., Soto, M. & Marigómez, I. Signs of recovery of mussels health two years after the Prestige oil spill. *Mar. Environ. Res.* **62**, 337–341 (2006).
13. Kim, Y., Powell, E. N., Wade, T. L. & Presley, B. J. Relationship of parasites and pathologies to

- contaminant body burden in sentinel bivalves: NOAA Status and Trends 'Mussel Watch' Program. *Mar. Environ. Res.* **65**, 101–127 (2008).
14. Amin, B., Ismail, A. & Arshad, A. Anthropogenic impacts on heavy metal concentrations in the coastal sediments of Dumai, Indonesia. 291–305 (2009). doi:10.1007/s10661-008-0159-z
 15. Adokoh, C. K., Obodai, E. A., Essumang, D. K. & Nyarko, B. J. B. Statistical Evaluation of Environmental Contamination, Distribution and Source Assessment of Heavy Metals (Aluminum, Arsenic, Cadmium, and Mercury) in Some Lagoons and an Estuary Along the Coastal Belt of Ghana. 389–400 (2011). doi:10.1007/s00244-011-9643-5
 16. Lanceleur, L., Schäfer, J., Chiffolleau, J., Blanc, G., Auger, D., Renault, S., Baudrimont, M. & Audry, S. Long-term records of cadmium and silver contamination in sediments and oysters from the Gironde fluvial-estuarine continuum - evidence of changing silver sources. *Chemosphere* **85**, 1299–305 (2011).
 17. Marigómez, I., Soto, M., Cajaraville, M. P. & Angulo, E. Cellular and Subcellular Distribution of Metals in Molluscs. **392**, 358–392 (2002).
 18. Jimeno, A. Cellular and subcellular distribution of metals and metal nanoparticles, biomarkers and histopathology in mussels, *Mytilus galloprovincialis*, exposed to engineered metal nanoparticles (ZnO, CdS, Ag, Au, and TiO₂). Doktoradutza-Tesia. UPV/EHU. 270pp. (2014).
 19. Seiler, G. R. & Morse, M. P. Kidney and hemocytes of *Mya arenaria* (Bivalvia): Normal and pollution-related ultrastructural morphologies. *J. Invertebr. Pathol.* **52**, 201–214 (1988).
 20. Bigas, M., Durfort, M. & Poquet, M. Cytological response of hemocytes in the European flat oyster, *Ostrea edulis*, experimentally exposed to mercury. *BioMetals* **19**, 659–673 (2006).
 21. Foster, B., Grewal, S., Graves, O., Hughes, F. M. & Sokolova, I. M. Copper exposure affects hemocyte apoptosis and *Perkinsus marinus* infection in eastern oysters *Crassostrea virginica* (Gmelin). *Fish Shellfish Immunol.* **31**, 341–349 (2011).
 22. Blanchard, J., Brix, K. & Grosell, M. Subcellular fractionation of Cu exposed oysters, *Crassostrea virginica*, and Cu accumulation from a biologically incorporated Cu rich oyster diet in *Fundulus heteroclitus* in fresh and sea water. *Comp. Biochem. Physiol. - C Toxicol. Pharmacol.* **149**, 531–537 (2009).
 23. Amiard-Triquet, C., Berthet, B. & Martoja, R. Influence of salinity on trace metal (Cu, Zn, Ag) accumulation at the molecular, cellular and organism level in the oyster *Crassostrea gigas* Thunberg. *Biol. Met.* **4**, 144–150 (1991).
 24. Marigómez, J. A., Cajaraville, M. P. & Angulo, E. Cellular cadmium distribution in the common winkle, *Littorina littorea* (L.) determined by X-ray microprobe analysis and histochemistry. *Histochemistry* **94**, 191–199 (1990).
 25. Danscher, G. Autometallography. A new technique for light and electron microscopic visualization of metals in biological tissues (gold, silver, metal sulphides and metal selenides). *Histochemistry* **81**, 331–335 (1984).
 26. Brooks, S., Lyons, B., Goodsir, F., Bignell, J. & Thain, J. Biomarker responses in mussels, an integrated approach to biological effects measurements. *J. Toxicol. Environ. Health. A* **72**, 196–208 (2009).
 27. Ivanina, A. V., Hawkins, C. & Sokolova, I. M. Immunomodulation by the interactive effects of cadmium and hypercapnia in marine bivalves *Crassostrea virginica* and *Mercenaria mercenaria*. *Fish Shellfish Immunol.* **37**, 299–312 (2014).
 28. Rementeria, A., Mikolaczyk, M., Lanceleur, L., Blanc, G., Soto, M., Schäfer, J., Zaldibar, B. Assessment of the effects of Cu and Ag in oysters *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793) using a battery of cell and tissue level biomarkers. Marine Environmental Research. Bialduta.
 29. Jing, G., Li, Y., Xie, L. & Zhang, R. Metal accumulation and enzyme activities in gills and digestive gland of pearl oyster (*Pinctada fucata*) exposed to copper. *Comp. Biochem. Physiol. - C Toxicol. Pharmacol.* **144**, 184–190 (2006).
 30. Mikolaczyk, M., Rementeria, A., Lanceleur, L., Soto, M. & Marigomez, I. Estuarine, Coastal and Shelf Science Silver and copper bioaccumulation kinetics in oyster *Crassostrea gigas* tissues at environmentally relevant exposure levels using stable isotope spikes. 1–10 (2015). doi:10.1016/j.ecss.2015.07.025