

eman ta zabal zazu



Universidad  
del País Vasco

Euskal Herriko  
Unibertsitatea



ZTF-FCT

Zientzia eta Teknologia Fakultatea  
Facultad de Ciencia y Tecnología



Gradu Amaierako Lana  
Biologiako Gradua

# Amonioaren ekoizpenaren alometria interes komertzialeko txirletan

Egilea:  
Sofia Marcos Basagoiti  
Zuzendaria:  
Miren Begoñe Urrutia Barandika

# AURKIBIDEA

<b>Laburpena</b> .....	1
<b>Abstract</b> .....	1
<b>1. Sarrera</b> .....	2
<b>2. Material eta metodoak</b> .....	6
2.1. Txirlen jatorria eta esperimentuaren diseinua .....	6
2.2. Mantentze baldintzak eta dietaren ezaugarriak .....	7
2.3. Amonioaren eskrezio-tasa ( $\text{VNH}_4\text{-N h}^{-1}$ ) .....	7
2.4. Neurketa biometrikoak eta diseekzioa .....	8
2.5. Hazkuntza-tasa .....	9
2.6. <i>R. decussatus</i> eta <i>R. philippinarum</i> espezieen arteko konparaketa .....	9
2.7. Datuen analisisa .....	9
<b>3. Emaitzak</b> .....	10
3.1. <i>R. philippinarum</i> espeziea .....	10
3.1.1. Parametro biometrikoak .....	10
3.1.2. Amonioaren eskrezio-tasa eta tamaina.....	12
3.2. <i>R. decussatus</i> eta <i>R. philippinarum</i> espezieen arteko konparaketa .....	14
3.2.1. Parametro biometrikoak .....	14
3.2.2. Amonioaren eskrezio-tasa eta tamaina.....	16
<b>4. Eztabaida</b> .....	16
<b>5. Ondorioak</b> .....	19
<b>Esker onak</b> .....	19
<b>Bibliografia</b> .....	20

## Laburpena

Lan honen helburua, *Ruditapes philippinarum* txirla japoniarrean eta *Ruditapes decussatus* txirla handian amonioaren eskrezio-tasa eta tamainaren arteko erlazio alometrikoa ezartzea izan da. Lortutako material biologikoaren ezaugarriak zirela eta, erlazio alometrikoa txirla japoniarraren kasurako baino ezin izan da modu egokian ezarri, eta txirla handiarekin lortutako datuak erkaketarako baino ezin izan dira erabili. Horrela, *R. philippinarum* espezieko ale gazteekin, parametro biometrikoak neurtu ziren batetik, eta ondoren amonioaren irazpen-tasa eta tamainaren arteko erlazio alometrikoa ezarri zen. Tamainaren adierazle modura, erlazio alometrikoak ezartzerakoan, animalien luzera, animalien pisu bizia eta ehunen pisu lehorra erabili izan dira, eta guztiekin frogatu da erlazioa ez dela isometrikoa. Gainera, neurketak lau hilabetetan zehar egin direnez, aukera egon da baieztatzeko baldintzak konstante mantenduz gero erlazio alometrikoak konstante mantentzen direla. Azkenik, *R. philippinarum* aleen neurketak, bai parametro biometrikoenak zein amonioaren irazpen-tasari dagozkionak, *R. decussatus* aleekin lortutakoekin erkatzean, desberdintasun esangarriak lortu izan dira bi espezieetan. Labur esanda, *R. decussatus* espezieko ale gazteen kondizio indizea esangarri altuagoa da, eta neurtutako tartean behintzat, amonioaren eskrezio-tasa nabarmen baxuagoak erakusten dituzte.

## Abstract

The aim of this research was to establish an allometric relation between ammonium excretion-rate and body-size in *Ruditapes philippinarum* (Japanese carpet shell) and *Ruditapes decussatus* (grooved carpet shell). Due to the characteristics of the biological material obtained, the allometric relation was only established for *R. philippinarum*, and *R. decussatus* was used to compare with *R. philippinarum* individuals. Thereby, biometric parameters were measured and ammonium excretion-rate and body-size relations were calculated in *R. philippinarum* juvenile individuals. Animal length, animal weight and flesh dry-weight were used as body-size representatives, and it was proved with all of them that the allometric relation was not isometric. Furthermore, as the measurements were made during four months, it was seen that allometric relations did not change if laboratory conditions were kept constant. Finally, when data from *R. philippinarum* individuals was compared with *R. decussatus*, significant differences were obtained. Although *R. decussatus* individuals showed better condition index, lower ammonium excretion-rates were obtained for them.

## 1. Sarrera

Molusku bibalbioak mundu mailako arrantza-sektoreko atal garrantzitsu bilakatu dira. 2014. urtean Europa osoan 632.000 tona bibalbio ekoitzi ziren, eta Espainia, Frantzia eta Italia izan ziren herrialde ekoizle garrantzitsuenak (FAO, 2016). Lan honetan azalduko den ikerketalangerako *Ruditapes philippinarum* (Adams and Reeve, 1850) txirla japoniarra, eta *Ruditapes decussatus* (Linnaeus, 1758) txirla handia hautatu dira. *R. philippinarum* Espainian kultibatzen den espezie garrantzitsuena da, *R. decussatus* eta *Venerupis pullastra* (Montagu, 1803) espezieekin batera. 2014. urtean, soilik Espainian espezie honen produkzioa 646 tonakoa izan zen eta haren balioa 4,4 milioi eurokoa (APROMAR, 2016). Txirla japoniarra Asiako kostalde Pazifikoko espeziea da jatorriz. 70. eta 80. hamarkaden artean Europara ekarri zen txirla handiak baino hazkuntza-tasa altuagoa zuelakoan eta estresarekiko erresistenteagoa zelakoan (Flassch and Leborgne, 1994; Gosling, 2003). Txirla handiak, hala ere, balio komertzial altuagoa du, bere haragiaren kalitatea oso baloratua dagoelako eta uretatik kanpo bizirik luzeago irauten duelako, zeinak ziklo komertzialaren luzapena ahalbidetzen duen (Ministerio del Medio Ambiente y el Medio Rural Marino, s.f.; FAO, 2015). *R. decussatus* txirlaren ekoizpena 2014. urtean Espainia mailan 167 tonakoa izan zen, 2,9 milioi eurotako balio ekonomikoa gaindituz (APROMAR, 2016).

*R. philippinarum* eta *R. decussatus* espezieak substratuan hondoraturik bizi dira. Nitxo ekologiko bera partekatzen dute eta elikatzeko-eredu zein dieta berdintsuak dituzte. Are gehiago, akuakultura zentroetan teknika berdinak erabiltzen dira bi espezie hauen hazkuntzarako. Larba fasean zehar akuakultura zentroetan ekoizitako algekin elikatuak eta ur-tankeetan mantenduak dira. Txirlen maskorrek 2-3 mm baino gehiago dutenean, aire zabalean dauden sarezko estrukturetara lekualdatzen dira. Fase honi loditze-fasea deritza. Egitura hauek ale txikien babeserako diseinatuak daude. Ekoizpen primario altuko estuario eta ur gaziko lakuetan jartzen dira eta ongarri naturalak gehitzen dira algen proliferazioa bultzatzeko. Kasu batzuetan, algen ekoizpen kontrolatua ere egiten da elikagai gabezia ekiditeko. Behin txirlak tamaina minimora heldurik, 10-15 mm ingurura, itsas hondoaren substratuan ereingo dira edo sareetan taldekatuko dira komertzializatuak izateko beharrezko tamaina lortu arte. Zenbait akuakultura zentroetan, loditze-fasea luzatu daiteke (Helm and Bourne, 2006).

Bibalbioak animalia iragazleak dira. Brankiak erabiltzen dituzte sifoietan zehar barneraturiko ura iragazi eta elikagaia eskuratzeko. Esekiduran dauden partikulez elikatzen dira. Hauen artean, fitoplanktona, mikro-zooplanktona eta baita detritua daude (Gosling, 2003). Akuakultura zentroetan balio proteiko altuko alga desberdinen nahasteak erabiltzen dira gehien bat, hala nola, *Isochrysis galbana* (T-ISO) eta *Chaetoceros calcitrans* espezieen konbinazioak (Helm and Bourne, 2006). Bertatik eskuratzen dituzte karbohidratoak, gantzak eta proteinak.

Lipido eta karbohidratoak erregai bezala jokatzen dute organismoan. Proteinak, aldiz, organismoaren estruktura- eta funtzio-elementu nagusiak dira.

Proteinak etengabe andeatu eta ekoizten dira organismoan. Sintesi eta degradazioaren arteko orekari *turnover* proteikoa deritza, eta esan bezala, katabolismo eta anabolismoaren arteko erlazioa adierazten du. Elikagaien proteinak lehenik hidrolizatu egingo dira digestioan eta aminoazido askeak hestean zehar xurgatuko dira. Aminoazidoen erabilera nagusiak proteinen zein peptidoen sintesirako unitate izatea eta baita beste aminoazidoen edota konposatu nitrogenatuen nitrogeno-iturri bezala jokatzea dira. Gehiegizko aminoazido kontzentrazioa izatean organismoan, hauen metaketa ezinezkoa denez, erregai metaboliko bezala erabiltzen dira (Berg et al., 2002).

Proteinak metabolizatzean, CO<sub>2</sub> eta H<sub>2</sub>O ekoizteaz gain, geroago kanporatuak izango diren zenbait nitrogeno molekula sinple sortzen dira. Amino taldea (-NH<sub>2</sub>) kenduko da eta amonioa sortuko da (NH<sub>3</sub>). Amonioa base ahula denez, H<sup>+</sup>-a erraz bereganatu dezake eta NH<sub>4</sub><sup>+</sup> bilakatuko da. Kontzentrazio altuetan, toxikoa izango da pH aldaketak eragingo dituelako eta ondorioz, zelula mailan kalteak sortuko direlako, hala nola, mintzak desantolatu, aminoazidoen estruktura aldatu eta, bibalbioen kasuan, maskorraren hazkuntza kaltetu daitezke. Beraz, nitrogeno-hondakinak kanporatzea ezinbestekoa da zelulen mantenurako. Animalia taldearen arabera, amonioa, azido urikoa edo urea eskretatzen da. Produktu hauen kanporaketa estuki erlasionaturik dago animalia taldeen habitatarekin. Lehorreko animaliek beharrezkoa dute metabolikoki garestiagoak diren konposatuak ekoiztea ur galera minimizatzeko. Animalia urtarrek aldiz, bibalbioak barne, ez dute ur-eskuragarritasun arazorik amonioa disolbatu eta kanporatzeko. Haren tamaina txikiak eta disolbagarritasun altuak molekularen barreiatze oso azkarra ahalbidetzen du medioan (Schmidt-Nielsen, 1997; Willmer et al., 2009).

Amonioa giltzurrun eta guruin perikardialen bidez kanporatua izango da bibalbioetan, baina ziur aski baita ere organismoaren tegumentuan eta zakatzetan zehar (Gosling, 2003). Amonioa kanporatzeak, zenbait abantaila ditu. Izan ere, nitrogeno proportzio altua du (H:N=3) azido uriko (H:N=1) eta urearekin (H:N=2) konparaturik. Gainera, ez du metabolismoan erabili daitezkeen karbono molekulen kanporaketa eskatzen (Willmer et al., 2009). Hala ere, hondakin produktuak kanporatzeak normalean balantze energetikoan kontuan hartzen ez den energia-gastua dakar organismoarentzat.

Fisiologia energetikoak, termodinamikako arauak jarraituz, organismoan ematen diren energia trukeak, eta energia eraldaketen efizientziak aztertzen ditu. Energiaren fluxuak ezagutzeak hainbat abantaila ditu organismoaren ezagutzarako eta haren ekoizpenerako. Bibalbioetan, balantze energetikoaren kalkuluak erabilgarriak dira bibalbio populazioen hazkuntza-tasa estimatzeko (Bayne and Newell, 1983). Baita ere, eduki energetiko desberdineko

elikagaien organismoaren energiaren erabileran izan dezaketen eragina aztertzeko. Modu honetan, espezie hauen hazkuntza optimizatu daiteke akuakultura-zentroetan. Energia sarrera eta irteerak baloratzeko adierazpen ohikoena Winberg-ek (1956) proposaturiko ekuazioa da:

$$P = C - (R + F + U),$$

non  $P$  ekoizpena (hazkuntza somatikoa zein gametikoa),  $C$  irentsitako elikagaien eduki energetikoa,  $R$  tasa-metabolikoa (tenperatura askapenarekiko baliokidea),  $F$  gorotzen eduki energetikoa eta  $U$  eskrezio bidez kanporaturiko energia diren.

Irentsitako elikagaien xurgapen-tasak ( $A$ ) mugatuko du bereganaturiko energia kantitatea:  $A = I - F$ . Hala ere, xurgaturiko energia guztia ez da organismoarentzat eskuragarri egongo. Beharrezkoa izango da konposatu organiko horien oxidazioa burutzea. Oxidazio horretan, amonioa sortuko da eta kanporatua izango da. Metabolismo zelularrerako eskuragarri dagoen energia asimilaturiko energia izango da:  $A' = A - U$ . Asimilaturiko energia metabolismoaren mantenurako eta lana sortzeko erabiltzen da. Animaliak biosintesisirako energia izango du, asimilaturiko energia gastu energetikoei eskatzen duten energia baino altuagoa bada. Animaliak hazkuntzarako (somatikoa zein gametikoa) eskuragarri duen energia kalkulatzeko “Scope for Activity” (*SFG*) erabiltzen da (Warren and Davis, 1967). *SFG* laborategiko baldintza kontrolatuetan eta epe laburreko esperimentuetan oso erabilgarria da animaliek izan dezaketen energia eskumendea estimatzeko:  $SFG = A' - R$  (Bayne and Newell, 1983; Gosling, 2003).

Moluskuak aztertzerakoan, amonioaren eskrezio bidez izandako energiaren galera normalean arbuatua izaten da:  $A = A'$ . Ondorioz, asimilazio-tasa gain-estimatu egiten da. Kondizio normaletan amonioaren eskrezioa xurgaturiko energia totalaren % 1-10 ingurukoa dela ikusi da (Bayne and Newell, 1983; Beiras et al., 1995; Han et al., 2008). Hainbat ikerketa-talde beraz, txirlen hazkuntzarako energia eskumendea kalkulatzeko ez dute eskrezio-tasa neurtzen (Delgado et al., 2011; Flye-Sainte-Marie et al., 2007; Munari and Mistri, 2007; Tamayo et al., 2011). Baina bibalbio espezie desberdinen amonioaren eskrezioa aztertutako ikerketetan, energia galera totalaren portzentaje txiki bat izan arren, proteinen katabolismoan duen garrantzia azpimarratu dute (Allen and Garrett, 1971; Arifin and Bendell-Young, 2001; Arranz et al., 2016; Gugale et al., 2017). Dietak duen eragina aztertzeko berebizikoa da amonioaren eskrezioa aztertzea. Izan ere, elikagaien proteinak ez dira guztiz oxidatzen. Ondorioz, hondakin nitrogenatuen kantitatea neurtzea garrantzitsua da datu errealistak lortzeko (Bayne and Newell, 1983).

Gutxi ikertua izateaz gain, argitaraturiko datuek adierazi dute eskrezio-tasa oso aldakorra dela molusku espezieen artean (Bayne and Scullard, 1977). Honek, amonioaren kanporaketak metabolismoan jokatzen duen papera adosteko zailtasunak sortzen ditu. Gainera, hainbat faktore

exogenok aldaketak eragin ditzakete. Hala nola, tenperaturak, elikagaien eskuragarritasunak eta konposaketa biokimikoak, eta ingurumeneko egoera osmotikoak. Faktore endogenoak ere kontuan hartu behar dira: ugalketa-zikloaren etapak eta tamainak (Bayne and Scullard, 1977; Gosling, 2003; Lauritsen and Mozley, 1989; Mann and Glomb, 1978).

Parametro fisiologiko gehienak gorputz-tamainarekin batera aldatzen dira. Baina mantentzen duten erlazioa tamainarekiko ez da erlazio isometrikoa (1:1), alometrikoa baizik. Hau da, parametro fisiologikoen eta tamainaren arteko erlazioa ezin da jatorritik igarotzen den funtzio lineal baten bidez adierazi. Hortaz, aldagaien arteko erlazioa ez da konstante mantenduko, X/Y erlazioa aldatu egingo da X-ren arabera. Honi, erlazio alometrikoa deritzo. Parametro fisiologiko eta tamainaren arteko erlazioa azaltzeko, unibertsalki adosturiko hurrengo ekuazioa erabiltzen da:

$$Y = aX^b .$$

Ekuazio honen adierazpen logaritmikoa hurrengoa litzateke:

$$\text{Log}Y = \text{Log}a + b \cdot \text{Log}X,$$

non  $Y$  tasa-fisiologikoa,  $X$  organismoaren tamaina (pisua, luzera edo unitate baliokidetan),  $b$  masa-berretzaile alometrikoa eta  $a$  proportzionaltasun konstantea diren (Hochachka and Somero, 2001; Willmer et al., 2009). Masa-berretzailea urte askotan zehar eztabaida-gai izan da.  $b$  balioak aldagai dependentea gorputz-tamainarekiko nola aldatzen den adierazten du. Lehen aldiz tasa metaboliko basala aztertu zenean mamalioetan, Rubner-ek (1883)  $b$  balioa  $2/3$  inguru zela proposatu zuen, azalera bolumen ratioak eraginda. Kleiber-ek (1932) geroago, sei ordenetako mamalioak aztertu zituen enpirikoki erlazio alometriko baten bidez. Kleiber-en kurbatik  $3/4$  legea proposatu zen. Geroago eginiko hainbat ikerketek, masa-berretzailearen balioa  $0,66$  eta  $0,75$  inguruan kokatzen zuten (Hochachka et al., 2003). Erlazio hau ez da soilik endotermoetan ezarri, baita ektodermo eta organismo unizelularretan ere (Hochachka and Somero, 2001). Hala ere, lorturiko azken emaitzek aldakortasun asko erakutsi dute masa-berretzaileari dagokionez. Beraz, badirudi ez dagoela tasa-metabolikorako arau unibertsalik, eta ezta beste parametro fisiologikoetarako (Hochachka et al., 2003).

Literaturari erreparatuz, *R. philippinarum* eta *R. decussatus* espezieetan ez da orain arte amonioaren eskreziotasaren eta tamainaren arteko erlazioirik ikertu. Lan honen helburua, txirla japoniarren ale gazteentzako koefiziente alometriko bat lortzea da etorkizunean egingo diren txirla gazteen esperimentuetan irazpen-tasaren datuak estandarizatzeko tresna bat izateko. Izan ere, txirlen lehen estadioetako hazkuntza da akuakultura zentroetan gehien kontrolatzen dena. Horrela, hazkuntzarako energia eskumendearen neurketa zehatzak lortuko dira haien dinamika energetikoa hobeto ulertzeko. Bestetik, *R. decussatus* eta *R. philippinarum* arteko konparaketa bat egin nahi izan da bi espezieen arteko desberdintasunak aztertzeko amonioaren irazpen-tasan.

Zenbait lan erreferentziatzen harturik (Arranz et al., 2016; Farías et al., 2009), lan honen hipotesiak hurrengoak dira. Hasteko, amonioaren eskreziotasa eta tamainaren artean erlazio alometrikoa espero da. Gainera, neurri berdineko txirletan erlazio honek aldaketa esangarririk ez izatea espero da denboran zehar, laborategiko baldintzak konstante mantenduko zirelako. Azkenik, amonioaren eskreziotasan txirla japoniarraren eta txirla handiaren artean desberdintasun esangarriak aurkitzea espero da.

## 2. Material eta metodoak

### 2.1. Txirlen jatorria eta esperimenduaren diseinua

*R. philippinarum* eta *R. decussatus* ale gazteak erabili ziren esperimendu honetarako, bizikloko fase goiztiarretan duten erantzuna aztertzeko. *R. philippinarum* guztiak 2015eko uztailean jaiotako kohorte berekoak ziren eta esperimendu momentura arte baldintza berdinetan mantendu ziren. Laborategira Tinamenor S.L. akuakultura zentrotik heldu ziren 2016ko martxoan. Laborategian mantendu ziren esperimendu garaira arte. Bibalbioak 9-21 mm-ko maskor-luzera tartean zeuden. Bi astetako aklimatazio epea izan zuten. Esperimenduaren hasieran, 2016ko urriaren 26an, animaliak, maskorraren luzeraren arabera, 1 mm-ko tarteko taldeetan taldekatu ziren, guztira 13 taldeetan banatuta. Talde bakoitzeko indibiduoak etiketaturiko kristalezko ontzietan mantendu ziren. Era honetan, neurketa fisiologikoak egiten ziren une bakoitzean, talde guztietako aleak (tamaina guztietako aleak harturik) hautatzen zirela ziurtatu zen. Taldekapenetik aurrera, ale guztiak baldintza berdinetan mantendu ziren. Esperimendu amaieran, bibalbioak 28 mm arte haztea lortu zen.

*R. decussatus* espezieko 20 indibiduo CIMA (Centro de Cultivos Marinos de Ribadeo) akuakultura zentrotik ekarri ziren 2017ko otsailean. Bi asteko aklimatazioa izan zuten laborategian. Hortik aurrera, *R. philippinarum* espeziearekin erabilitako prozedura berbera jarraitu zen eta baldintza berdinetan mantendu ziren. Maskorraren luzera-tartea, baina txikiagoa izan zen, 10-13 mm artekoa, besterik ez baitzeukaten adostutako zentroan. Guztiak ontzi batean mantendu ziren ale guztiak kontrolaturik edukitzeko eta *R. philippinarum* aleengandik bereizteko.

Laborategian itsas urez beteriko tanke batean tenperatura, baldintza osmotiko eta elikadura-baldintza konstanteetan mantendu ziren. Esperimenduak 4 hile iraun zituen. Parametro biometriko eta fisiologikoen neurketak bi ataletan banatu ziren. Lehen atalean, 2016ko azarotik abendura (1. astea: 2016/11/07; 2. astea: 2016/11/14; 3. astea: 2016/11/21), *R. philippinarum* populazio erdia baino zerbait gehiago neurtu zen. Bigarren atalean, 2017ko otsailetik martxora, *R. philippinarum* populazioko azken aleak (4. astea: 2017/02/28) eta *R. decussatus*-en aleak (5. astea: 2017/03/07) neurtu ziren. Horrela, lau hile horietan zehar amonioaren eskreziotasan gerta



zitezkeen aldaketak aztertzeo aukera izan zen. Bestetik, lau hileen ostein laborategian mantendutako *R. philippinarum* bibalbioen hazkuntza aztertzeo aukera izan zen.

## 2.2. Mantentze baldintzak eta dietaren ezaugarriak

*R. philippinarum* eta *R. decussatus*-en aleak 50 L-ko ur-tankean mantendu ziren. Tankea, bestalde, 800 L-ko itsas uraren zirkulazio-sistema itxi batean murgildurik zegoen. Ura  $16 \pm 1$  °C-ko temperaturara zegoen. Tankeek aireztatena zuten eta itsas ur iragaziaren gazitasuna 33 psu-koa zen. Tankeko ura bi egunean behin berriztatzen zen.

Elikagai-hornidura etengabekoa eta erregulatua izan zen esperimentazio prozesu osoan zehar. Horretarako, ponpa peristaltikoak erabili ziren dieta dosifikatzeko. Elikagai-hornidura konstantea zela ziurtatzeko, tankean esekiduran zeuden partikulen bolumena  $1-1,5 \text{ mm}^3 \text{ L}^{-1}$  artean mantendu zen Coulter Counter Multisizer III (Beckman Coulter) erabiliz. Dieta *I. galbana* alga oinarritzen zen. *I. galbana* laborategian ekoitzi eta mantendu zen haren hazkuntza eta bizi-zikloa kontrolatuz esperimentazio-prozesu osoan zehar. Shellfish Diet 1800™ (Instant algae®) itsas mikroalgen nahaste kontzentratua gehigarri nutritibo bezala erabili zen. Shellfish-a *I. galbana* algaren bolumenaren arabera gehitzen zen honen %5-a izateko. Algaren monokultiboaren kalitatea eta kontzentrazioa egunero aztertzen zen dieta jarri aurretik. Dieta disoluzioak egun birik behin berriztatzen ziren, eta, matrazeak eta hodi-sistemak garbitu egiten ziren aldaketa bakoitzean.

## 2.3. Amonioaren eskrezio-tasa ( $\text{VNH}_4\text{-N h}^{-1}$ )

Amonioaren eskrezio-tasa neurtzeko, aleak bakarka Falcon hodietan mantendu ziren 3 orduz temperatura konstantean ( $16 \pm 1$  °C) zegoen ur-tanke batean. Prozedura honi inkubazioa deritzo. Astean batez beste 40 indibiduo inkubatu ziren. Neurketak bi egunetan egiten ziren, egun bakoitzean 20 ale aztertu ziren. Ondoren, beste tanke independente batean indibidualizaturik mantendu ziren ontzi txikietan disekzio egunera arte. Inkubazioak goizean egiten ziren. 8:00etan edo 11:15etan jartzen ziren, egunean zeharreko aldakortasuna ezabatzeko. Izan ere, kohorte bakoitzeko txirlek badirudi ziklo zirkadiano desberdinak dituztela eta eguneko orduak irazpen-tasan eragin dezakela (Langton et al., 1977). Inkubatu beharreko bibalbioak jatorriz banaturiko talde guztietatik zoriz hautatzen ziren, tamaina guztietako indibiduoak izateko inkubazio bakoitzean. Helburua, astean artean amonioaren eskrezioan egon litezkeen desberdintasunak minimizatzea zen, tamainaren eta amonioaren eskrezioaren arteko erlazio alometrikoa ahalik eta fidagarriena izateko.

Animaliak inkubatzen jarri aurretik, biofilm mikrobianoak garbitu ziren maskorretatik kontu handiz inkubazio aurreko unean. Izan ere, biofilm hauek  $\text{N}_2\text{O}$  ekoizle esangarriak dira. *Mytilus edulis* espeziean  $\text{N}_2\text{O}$  totalaren % 18-94a ekoiztera hel daitezkeela frogatu da (Heisterkamp et al., 2013). Falcon hodiak erabili ziren inkubaziorako. 9-14 mm arteko txirlak 30

mL ur iragaziarekin eta 14-28 mm arteko txirlak 50 mL ur iragaziarekin. Itsas ura aurretik iragazia zen positibo faltsuak baztertzeko (0,47  $\mu\text{m}$  PALL mintz-iragazkiak). Izan ere, itsas uretan nitrogenodun konposatuak ekoizten dituzten mikroorganismoak aurkitzen dira. Temperatura konstante mantendu zen Falcon hodiak bainu isoterma batean murgilduz. 180 minutuko inkubazio-aldiaren ostean 10 mL-ko bi errepika hartu ziren Falcon hodi bakoitzeko. Saiodiak egokiro itxita mantendu ziren hozkailuan Solórzano-k (1969) deskribaturiko fenol-hipoklorato metodoaren bidezko amonioaren determinazioa egin arte. 10 mL-ko itsas ur iragaziko bi kontrol erabili zen. Laginen amonio kontzentrazioa UV-160A (Shimadzu) espektrofotometro bidez neurtu zen.  $\text{NH}_4\text{Cl}$ -rekin egindako 0-40  $\mu\text{g}$ -ko zuzen patroia bat erabili zen eta inkubazio-bolumen eta -denbora patroia tarte horretara doitu zen.

Eskreziotasak kalkulatzeko hurrengo prozedura erabili zen (Arranz *et al.*, 2016):

$$VNH4 - N = (\mu M - \mu M_C) \cdot \frac{14,06}{1000} \cdot \frac{1}{Vol \cdot t}$$

non  $VNH4 - N$  ( $\mu\text{g NH}_4\text{-N}\cdot\text{h}^{-1}$ ) amonioaren eskreziotasari deritzon;  $\mu M$  eta  $\mu M_C$  laginaren eta kontrolaren amonio kontzentrazioak diren,  $Vol$  inkubazio-bolumena (mL) eta  $t$  denbora (h).

#### 2.4. Neurketa biometrikoak eta disezioa

Neurketa biometrikoak oso garrantzitsuak dira animalien egoerari buruzko informazioa ematen dutelako. Ikerketa honetan, bi espezieen egoera ezagutzea ezinbestekoa da, amonioaren eskreziotasun berezitasunak antzemateko datuak lor daitezkeelako. Disekzionatu aurretik, maskorraren luzera neurtzeko 0,1mm-ko zehaztasuneko kalibre digitala erabili zen (Mitutoyo®). Gainera, txirlen pisu bizia ere pisatu zen  $10^{-4}\text{g}$ -ko Sartorius balantza bat erabiliz.

Amonioaren eskreziotasun kalkulatu ostean, txirlak disekzionatuak izan ziren ehunen eta maskorraren pisu hezea eta pisu lehorra neurtzeko. Pisu hezea disekzionatu eta zuzenean neurtu zen. Pisu lehorra neurtzeko laginak  $100^\circ\text{C}$ -ko labean mantendu ziren 24 orduz. Pisaketak  $10^{-4}\text{g}$ -ko Sartorius balantza bat erabiliz egin ziren.

Datuekin, ehunen hidratazio-portzentajea (%) kalkulatu zen:

$$\text{Hidratazio-portzentajea}(\%) = \frac{EhunenPF - EhunenPL}{EhunenPF} \cdot 100,$$

non  $PL$  pisu lehorra (mg) eta  $PF$  pisu freskoa (mg) diren.

Azkenik, kondizio indizea (KI) neurtu zen. Datu honen bidez, maskorraren eta ehun bigunen arteko erlazioa aztertu zen. Hurrengo adierazpena erabili zen kondizio indizea lortzeko (Mann and Glomb, 1978):

$$KI(\%) = \frac{EhunarenPL}{MaskorrarenPL} \cdot 100.$$

### 2.5. Hazkuntza-tasa

Hazkuntza-tasa ezagutzea ere erabilgarria da populazioaren egoera baloratzeko. Aleak hazi badira, mantenurako energiaz gain, energia erabilgarria duten seinale da. *R. philippinarum* espeziearen populazio osoaren batez besteko hazkuntza-tasa erlatiboa (HT) kalkulatzeko, bi neurketa egin ziren esperimentuan zehar. Maskorraren luzera erabili zen hazkuntza aztertzeko. Populazioaren neurketak esperimentu hasieran (2016-10-26an) eta lau hile geroago (2017-03-02an) egin ziren. Bi neurketa horietan lorturiko batez bestekoetatik, hazkuntza-tasa erlatiboa kalkulatu zen:

$$HT = \frac{La - Lh}{(Ta - Th) \cdot Lh},$$

non *La* amaierako eta *Lh* hasierako tamaina, eta *Ta* amaierako eta *Th* hasierako datak diren.

### 2.6. *R. decussatus* eta *R. philippinarum* espezieen arteko konparaketa

Bi espezieen arteko konparaketa egiteko *R. decussatus* espeziaren aleak tamaina bereko *R. philippinarum* espezieekin erkatu ziren (10-14 mm). Horretarako, *R. decussatus* 19 ale eta *R. philippinarum* 29 ale erabili ziren. Pisu bizia, ehunen zein maskorren PL, KI eta amonioaren eskrezio-tasa konparatu ziren.

### 2.7. Datuen analisisia

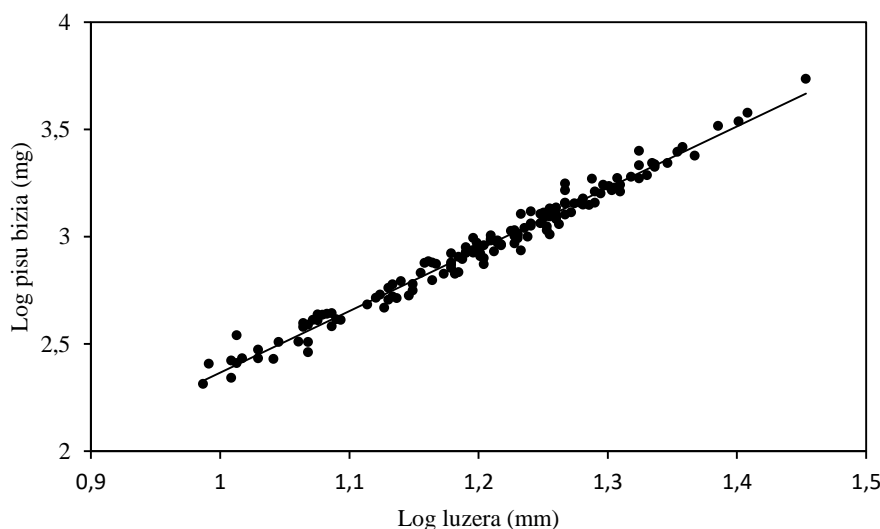
Parametro biometriko eta fisiologikoen arteko erlazio alometrikoak hurrengo ekuazioaren bidez adierazi zen:  $Y=aX^b$ , non *a* proportzionaltasun konstantea eta *b* masa-berretzailea diren. Erlazio guztiak logaritmizatu egin ziren, ekuazio linealak lortzeko  $LogY=bLogX+Loga$ . Parametro desberdinetarako, txirlak ikertu ziren asteetan zehar lorturiko datuen erlazio alometrikoen arteko desberdintasunak aztertzeko kobariantza analisisia egin zen (ANCOVA; Zar, 1984) R programa estatistikoaren bidez. Desberdintasunik lortu ez zenean asteetan zehar, malda eta proportzionaltasun konstante komunak kalkulatu ziren erregresio komun bat lortzeko. *R. philippinarum* eta *R. decussatus* aleak konparatzeko Student-t-en testa erabili zen SPSS programa estatistikoaren bidez.

### 3. Emaitzak

#### 3.1. *R. philippinarum* espeziea

##### 3.1.1. Parametro biometrikoak

Txirlen pisu bizia 200-5451 mg artean zegoen. Pisu bizia eta maskorraren luzeraren arteko erlazioa modu linealean ezartzeko, datu logaritmikoak erabili ziren. Lorturiko erregresio lineala hurrengoa zen:  $\text{Log pisu bizia} = 2,8696 \cdot \text{Log luzera} - 0,5029$ . Ekuazio linealaren esangarritasuna aztertzeko korrelazio koefizientea erabili zen:  $R^2 = 0,979$  ( $n = 144$ ;  $p < 0,05$ ) (1. irudia).



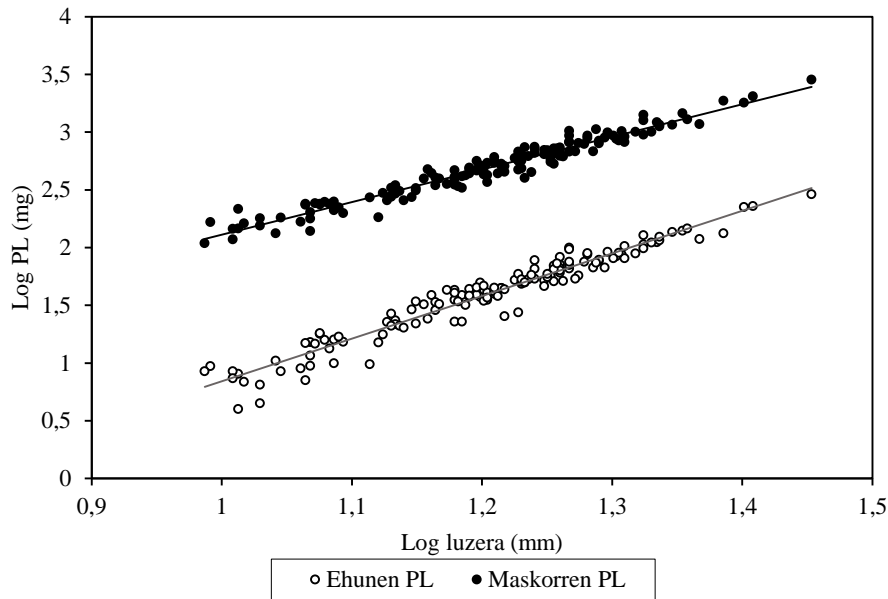
1. irudia. *R. philippinarum* espeziearen pisu biziaren (mg) eta luzeraren (mm) arteko log-log erlazioa.

Ehunen eta maskorraren pisu lehorrak luzerarekin zuten erlazioa aztertu zen baita ere. Datuak logaritmora eraldatu ziren, erregresio linealak lortzeko (2. irudia). Hurrengo ekuazioak lortu ziren:

- Maskorraren pisu lehorra eta luzeraren arteko erlazioa:  
 $\text{Log maskorraren PL} = 2,83 \cdot \text{Log luzera} - 0,71$   $R^2 = 0,949$  ( $n = 144$ ,  $p < 0,05$ ).
- Ehunen pisu lehorra eta luzeraren arteko erlazioa:  
 $\text{Log ehunen PL} = 3,69 \cdot \text{Log luzera} - 2,84$   $R^2 = 0,94$  ( $n = 144$ ,  $p < 0,05$ ).

Ekuazio biak konparatzean ANCOVA bidez, malda eta jatorrizko ordenatuaren balioak desberdinak zirela frogatu zen ( $t$  malda = 9,067;  $t$  jatorrizko balioa = 104,21;  $p < 0,05$ ). Grafikoan ikus daitekeen bezala, distantzia handiagoa dago bi parametro hauen artean luzera txikiko txirletan txirla handietan baino. Ehunen pisu lehorren ekuazioak malda handiagoa duenez, bi funtzioen arteko distantzia murriztu egiten da luzeraren balio altuetan (2. irudia).

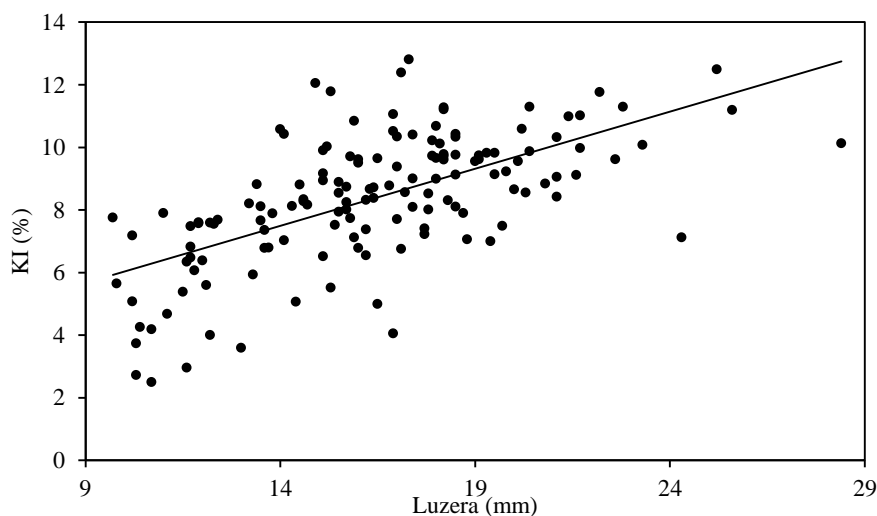
Bestalde, atal bakoitzaren hidratazio-portzentajea kalkulatu zen. Ehunen batez besteko hidratazio-portzentajea %  $78,50 \pm 2,18$ -koa zen. Maskorren batez besteko hidratazio-portzentajea, aldiz, %  $5,05 \pm 4,3$ -koa zen.



**2. irudia.** *R. philippinarum* aleen ehunen eta maskorren PL-ak (mg) eta luzeraren (mm) arteko log-log erlazioa.

Kondizio indizea aztertzerakoan, aldakortasun nahiko handia ikusi zen tamaina bereko aleen artean aztertutako luzera guztietarako, balioak bikoiztu ere egiten baitziren. Edonola ere, argi ikusi zena zera zen: kondizio indizea altuagoa zela txirlen tamaina handiagoa zen heinean. Ale handienek kondizio indize altuagoak erakusten zituzten ale txikienekin konparaturik. Batez beste, kondizio indizearen balio hirukoitzak erakusten zituzten erabilitako animalia handienek txikienekin erkatuz (3. irudia).

Hainbat ikerketetan behatu izan da kondizio indizea sasoiaren arabera aldatu egiten dela (Castro and de Mattio, 1987; Marin et al., 2003). Esperimentazio fasean zehar kondizio indizea aldatu zen aztertzeko, ANCOVA analisisia egin zen. Testaren arabera, ez ziren desberdintasun esangarriak lortu maldan ezta jatorrizko ordenatuan (1. taula). ANCOVA testak, ekuazio komun bat kalkulatu zuen:  $KI = 0,36 \cdot Luzera + 2,38$ .



**3. irudia.** *R. philippinarum* aleen kondizio indizea luzeraren arabera irudikatuta.

**1. taula.** *R. philippinarum* aleen KI-ren eta luzeraren arteko erlazioaren erregresio parametroak aste bakoitzean.

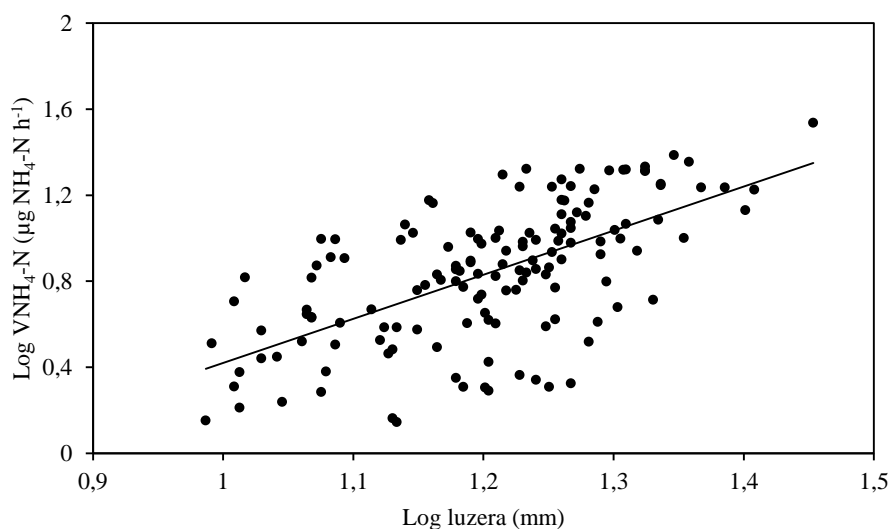
	Ekuaioa	n	R <sup>2</sup>	p	ANCOVA testa
1. astea	$y = 0,34 x + 2,539$	29	0,383	< 0,001	
2. astea	$y = 0,42 x + 1,658$	25	0,511	< 0,001	Fb = 1,08; p = 0,684
3. astea	$y = 0,48 x + 1,054$	36	0,513	< 0,001	Fa = 1,68; p = 0,1734
4. astea	$y = 0,34 x + 2,607$	54	0,332	< 0,001	
ANCOVA	$y = 0,36 x + 2,383$	144			

Azkenik, ikerketa honetarako erabilitako txirlen egoera nutrizionalaren ideia bat izateko, hazkuntza tasaren estimazio bat egin zen. 125 egunetan, txirlak batez besteko 2,79 mm hasi ziren, hots, 0,0016 mm/mm·egun-eko hazkuntza erlatiboa izan zuten.

### 3.1.2. Amonioaren eskrezio-tasa eta tamaina

Amonioaren eskrezio-tasa eta tamainaren arteko erlazioa aztertzeko, hiru parametro desberdin erabili ziren. Lehenik, irazpen-tasa txirlen luzerarekiko konparatu zen. Ondoren, pisu biziarekiko eta azkenik, pisu lehorarekiko.

*R. philippinarum* aleen amonioaren eskrezio-tasak maskorraren luzerarekiko aztertzean, datuak logaritmorra eraldatu ziren erregresio lineal bat lortzeko (4. irudia). ANCOVA testaren bidez, asteetan zehar funtzioen artean desberdintasunak zeuden aztertu zen. Asteak erkatzean, ez zen desberdintasun esangarririk lortu; eta beraz, hurrengo ekuazio komuna kalkulatu zen:  $\text{Log VN}_{\text{H}_4\text{-N}} = 2,13 \cdot \text{Log luzera} - 1,72$  (4. irudia; 2. taula).

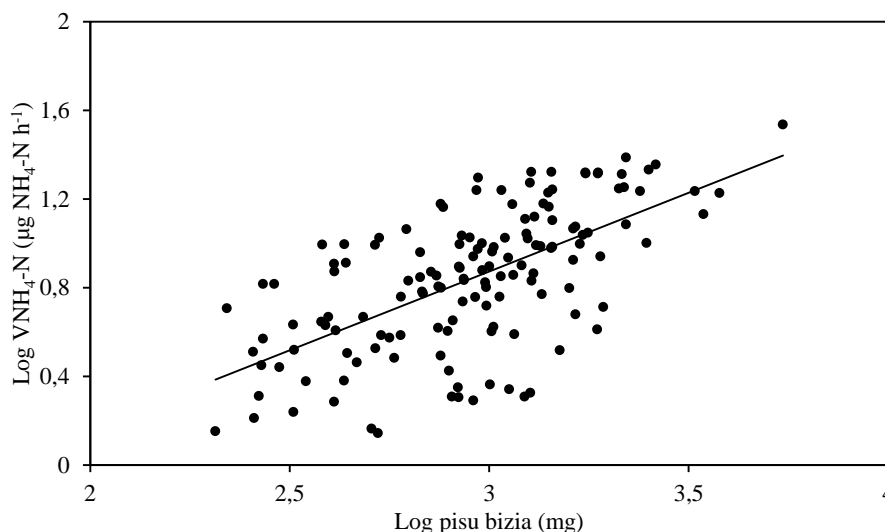


**4. irudia.** *R. philippinarum* aleen amonioaren eskrezio-tasa ( $\mu\text{g NH}_4\text{-N}\cdot\text{h}^{-1}$ ) eta maskorraren luzeraren (mm) arteko log-log erlazioa.

**2. taula.** *R. philippinarum* aleen amonioaren eskrezio-tasaren ( $\mu\text{g NH}_4\text{-N h}^{-1}$ ) eta luzeraren (mm) arteko log-log erregresio linealaren parametroak neurraketa-aste desberdinetan.

	<b>Ekuazioa</b>	<b>n</b>	<b>R<sup>2</sup></b>	<b>p</b>	<b>ANCOVA testa</b>
<b>1. astea</b>	$y = 2,8 x - 2,57$	29	0,410	< 0,001	
<b>2. astea</b>	$y = 1,13 x - 0,479$	25	0,208	0,012	$Fb = 2,269; p = 0,083$
<b>3. astea</b>	$y = 2,59 x - 2,24$	36	0,542	< 0,001	$Fa = 0,911; p = 0,437$
<b>4. astea</b>	$y = 1,94 x - 1,51$	54	0,317	< 0,001	
<b>ANCOVA</b>	$y = 2,13 x - 1,72$	144			

*R. philippinarum* aleen amonioaren eskrezio-tasa pisu totalarekiko aztertzean, ANCOVA testarekin ez zen aldakortasun esangarririk behatu asteen artean. Amonioaren eta pisu totalaren arteko erlazioa, hortaz, horrela adierazi zen:  $\text{Log VN}_{\text{NH}_4\text{-N}} = 0,74 \cdot \text{Log pisu bizia} - 1,35$ . (4. irudia, 3. taula).

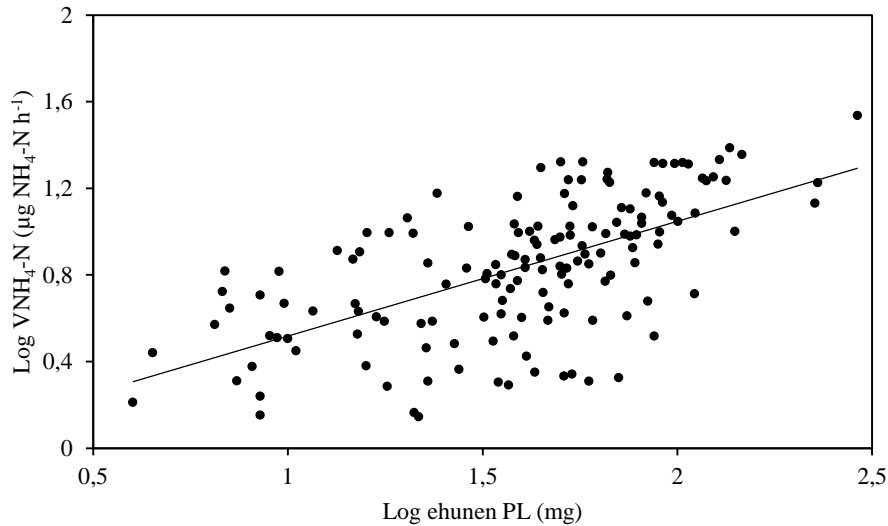


**5. irudia.** *R. philippinarum* aleen amonioaren eskrezio-tasa ( $\mu\text{g NH}_4\text{-N h}^{-1}$ ) pisu biziarekiko (mg) log-log adierazpena.

**3. taula.** *R. philippinarum* aleen amonioaren eskrezio-tasaren ( $\mu\text{g NH}_4\text{-N h}^{-1}$ ) eta pisu biziaren (mg) arteko log-log erregresio linealaren parametroak neurraketa-aste desberdinetan.

	<b>Ekuazioa</b>	<b>n</b>	<b>R<sup>2</sup></b>	<b>p</b>	<b>ANCOVA testa</b>
<b>5. astea</b>	$y = 0,99 x - 2,11$	29	0,397	< 0,001	
<b>6. astea</b>	$y = 0,39 x - 0,27$	25	0,185	0,019	$Fb = 2,476; p = 0,064$
<b>7. astea</b>	$y = 0,93 x - 1,85$	36	0,574	< 0,001	$Fa = 0,976; p = 0,406$
<b>8. astea</b>	$y = 0,66 x - 1,11$	54	0,325	< 0,001	
<b>ANCOVA</b>	$y = 0,74 x - 1,35$	144			

Amonioaren eskrezio-tasa eta ehunen pisu lehorraren arteko erlazioa aztertzean asteen artean ANCOVA bidez, aldakortasuna ez zen adierazgarria. Erlazioa konstante mantendu zen kasu honetan ere neurraketa eginiko asteetan zehar. Beraz, ekuazio komun bat kalkulatzeko ahalbidetu zuen:  $\text{Log VN}_{\text{NH}_4\text{-N}} = 0,5504 \cdot \text{Log ehunen PL} - 0,0424$  (6. irudia; 4. taula).



**6. irudia.** *R. philippinarum* espeziaren amonioaren eskrezio-tasa ( $\mu\text{g NH}_4\text{-N}\cdot\text{h}^{-1}$ ) pisu lehorraren (mg) arabera eskala logaritmikoan adierazirik.

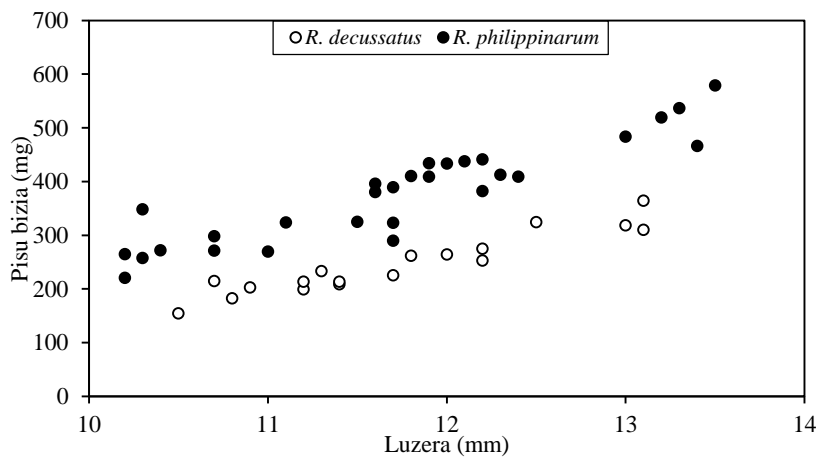
**4. taula.** *R. philippinarum* aleen amonioaren eskrezio-tasaren ( $\mu\text{g NH}_4\text{-N h}^{-1}$ ) eta ehunen pisu lehorraren (mg) arteko log-log erregresio linealen arteko konparaketa aste desberdinetan.

	Ekuaioa	n	R <sup>2</sup>	p	ANCOVA testa
1. astea	$y = 0,72 x - 0,343$	29	0,328	< 0,001	F b = 1,655; p = 0,1797 Fa = 0,8678; p = 0,4595
2. astea	$y = 0,35 x - 0,327$	25	0,309	< 0,001	
3. astea	$y = 0,68 x - 0,206$	36	0,55	< 0,001	
4. astea	$y = 0,519 x - 0,002$	54	0,355	< 0,001	
ANCOVA	$y = 0,562 x - 0,0575$	144			

### 3.2. *R. decussatus* eta *R. philippinarum* espezieen arteko konparaketa

#### 3.2.1. Parametro biometrikoak

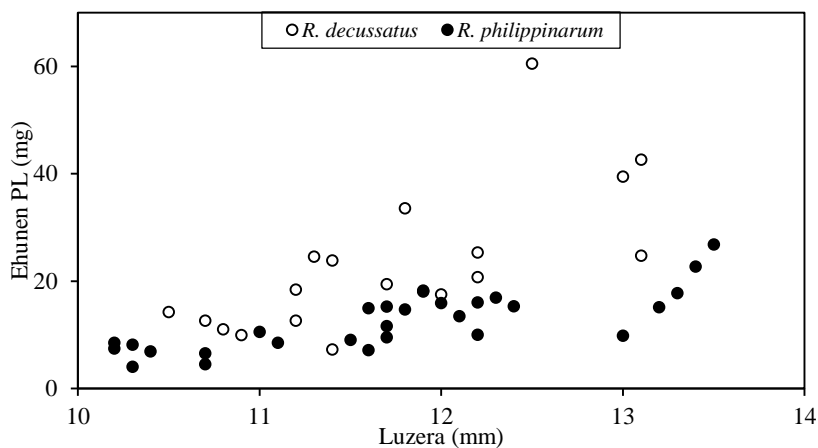
*R. decussatus* aleak *R. philippinarum* aleekin erkatzean, luzera berdinerako (10-14 mm) txirla japoniarrak pisu bizi altuagoa zuten. Txirla handiaren pisu biziaren batez bestekoa  $245,24 \pm 55,57$  mg zen bitartean, txirla japoniarren batez bestekoa  $378,53 \pm 91,26$  mg zen (7.irudia). Estatistikoki desberdintasunak esangarriak ziren (Student-t = -6,223;  $p < 0,05$ ).



**7. irudia.** *R. decussatus* eta *R. philippinarum* aleen pisu biziaren konparaketa luzerarekiko.



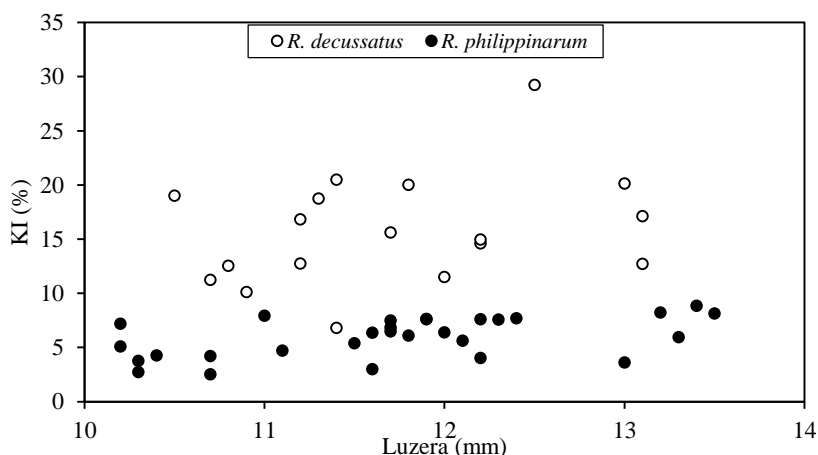
Ehunen pisu lehorra konparatzean aldiz, txirla handien batez besteko pisua dezente altuagoa zen txirla japoniarrena baino, ia bikoitza. Izan ere, *R. decussatus* aleek batez besteko  $23,21 \pm 13,52$  mg zuten pisu lehorra. *R. philippinarum* aleek ordea, batez besteko  $12,51 \pm 5,43$  mg (8. irudia). Desberdintasuna estatistikoki esangarria zen kasu honetan ere (Student-t = 3,816;  $p < 0,05$ ).



**8. irudia.** *R. decussatus* eta *R. philippinarum* aleen ehunen pisu lehorrak (mg) luzerarekiko (mm).

Maskorraren pisuak erkatzean, desberdintasunak behatu ziren (Student-t = -5,003;  $p < 0,05$ ). Txirla handiak batez besteko  $140,39 \pm 31,87$  mg eta txirla japoniarrak batez besteko  $208,25 \pm 51,68$  mg pisatzen zuten.

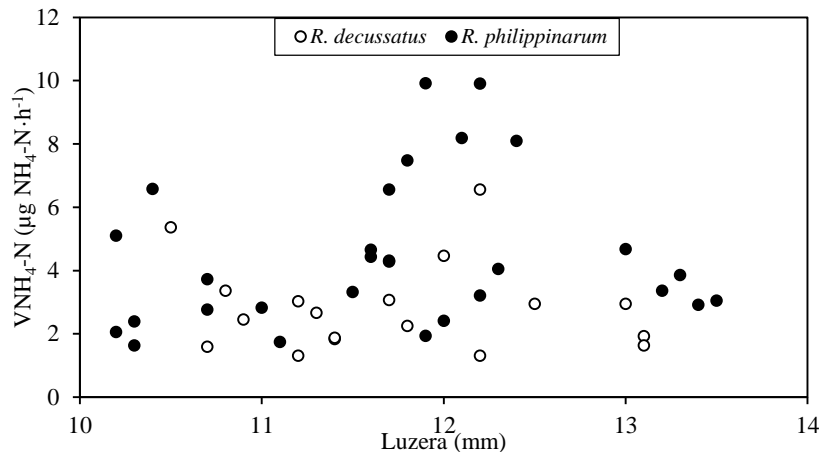
*R. decussatus* kondizio indizea %  $15,84 \pm 6,70$  mg zen, eta *R. philippinarum* aleen batez bestekoa %  $5,94 \pm 1,84$  mg. Erlatiboki, garrantzi handiagoa du pisu bizian ehunen pisuak *R. decussatus* aleetan. Izan ere, *R. decussatus* aleen kondizio indizea *R. philippinarum* aleen hirukoitza zen (Student-t = -2,678;  $p < 0,05$ ).



**9. irudia.** *R. decussatus* eta *R. philippinarum* aleen kondizio indizearen(%) konparaketa luzerarekiko (mm).

### 3.2.2. Amonioaren eskrezio-tasa eta tamaina

*R. decussatus* aleen batez besteko amonio eskrezioa  $2,81 \pm 1,42 \mu\text{g}\cdot\text{h}^{-1}$  izan zen bitartean, *R. philippinarum* aleen batez bestekoa  $4,46 \pm 2,36 \mu\text{g}\cdot\text{h}^{-1}$ . Txirla japoniarrak ia amonio bikoitza eskretatu zuen. Batez bestekoak konparatzean, desberdintasun esangarriak aurkitu ziren (Student-t = -3,006;  $p < 0,05$ ) (10. irudia).



10. irudia. *R. decussatus* eta *R. philippinarum* aleen amonioaren eskrezio-tasa ( $\mu\text{g NH}_4\text{-N}\cdot\text{h}^{-1}$ ) luzerarekiko (mm).

## 4. Eztabaida

*R. philippinarum* aleetan pisu bizia, ehunen PL eta maskorren PL emendatu egin zen luzerarekin, esperotako erlazioen arabera. Txirlen pisu bizia nahiko berdintsua zen tamaina bereko aleen artean (1. irudia), baita ere maskorren pisu lehorra (2. irudia). Desberdintasunak aipagarriagoak ziren ehunen pisu lehorrean (2. irudia). Pisu biziaren eta luzeraren arteko erlazioan, *b* masa-berretzailerako 2,83 balioa lortu zen. 0,16-13,32 mm arteko *Perna viridis* muskuilu basatiekin eginiko saiakera batean, *b* balioa 2,95ekoa zen (Hemachandra and Thippeswamy, 2008). Ehunen pisu lehorrari erreparatuz, ehunen pisu lehorren eta luzeraren arteko erlazioan lorturiko *b* balioa 3,69 izan zen. *Mytilus galloprovincialis* muskuilu heldu basatiekin eginiko saiakera batean, 3,78-ko balioa lortu zen ehunen pisu lehorren eta luzeraren arteko erregresioaren maldarako (Arranz et al., 2016). *R. decussatus* txirlekin eginiko beste ikerketa batean (Urrutia et al., 1999), 2,4 – 3,35 arteko *b* balioak lortu ziren bi urteetan zehar aztertutako populazio desberdinekin. Azkenik, ikerketa honetan maskorren pisu lehorren eta luzeraren arteko erregresio linealean lorturiko malda 2,83 izan zen. *Mytilus galloprovincialis* muskuiluarekin eginiko saiakeran 2,63-ko balioa lortu zen. *b* balioak, beraz, oso parekoak izan ziren hiru kasuetan beste molusku espezie batzuekin konparatzean.

Kondizio indizea ezagutzea oso garrantzitsua da akuakulturan, era honetan produktuaren kalitatea ezagutu daitekeelako (Lucas and Beninger, 1985). Espero ez zen bezala, *R. philippinarum* txirla hauen KI emendatu egiten zen txirlen luzerarekin batera, *Mytilus*

*galloprovincialis* muskuiluan behatu zen bezala (Arranz et al., 2016). Honek adierazten du txirlak gero eta tamaina handiagoa izan, orduan eta ehun metaboliko aktiboen proportzioa altuagoa zela. Ez zen konstante mantentzen hazkuntza prozesuan zehar. KI-an tamaina bereko aleetan ikus zitezkeen aldakortasuna ehunen pisuaren ondoriozkoa litzateke. Izan ere, maskorren pisu lehorra nahiko berdintsua zen tamaina berdineko aleetan. KI-aren aldakortasuna batez ere ingurumen aldaketan ondoriozkoa izaten da (Rainer, 1992), baina laborategian baldintza konstanteak mantendu ziren. Agian faktore endogenoek edo biotikoek eragina izan zuten. Disekzioetan zehar, zenbait alek *Brown ring disease* (BRD) deituriko gaixotasuna azaldu zuten. Gaixotasun hau *Vibrio tapetis* mikroorganismoak eragiten du eta maskorraren barruan kolore marroizko eraztun bat eratzen du, zeinak digestio aparatua kaltetzen duen eta erreserben metaketa oztopatzen duen (Gosling, 2003). Gaixotasuna oso garaturik ez badago, ezinezkoa da aleak disekzionatu gabe antzematea (Paillard and Maes, 1994). Nahiz eta gaixorik zeuden aleak gainerako ale osasuntsuetatik baztertu esperimentera hasi aurretik, esperimentera zehar zenbait alek gaixotasun hau erakutsi zuten disekzionatzean. Datu hauek kontuan hartu ez arren, ezin gaitezke erabat ziur egon erabilitako zenbait animalia osasun-egoeraz. Agian oraindik sintoma argiak erakusten ez bazituzten ere, nolabaiteko kalteak izan zitezketelako. Hala ere, txirla japoniarren parametro biometrikoak ikusirik, populazioa egoera fisiologiko onean aurkitzen zen. Gainera, ez zuten soilik mantenurako energia eskuratzen, baizik eta egitura berrien biosintesisirako energia ere bazuten, populazioa hazi egin baitzen esperimentera prozesuan zehar.

Amonioaren ekoizpenaren eta pisu lehorren arteko erlazio alometrikoari buruzko informazioa oso urria da bibalbioetan, eta are gutxiago *R. philippinarum* espeziean. Amonioaren ekoizpenaren eta luzeraren arteko erlazioari dagokionez, oraindik informazioa eskasagoa da. Amonioaren eskrezio-tasa eta luzeraren arteko erlazioa ezartzean,  $b$  balioa 3 baino txikiagoa izan beharko litzateke. Eskrezio-tasa eta pisuaren arteko erlazioaren  $b$  balioa, aldiz, 1 baino txikiagoa izaten da gehienetan (Bayne and Newell, 1983). Amonioaren eskrezioa eta luzeraren arteko erlazioa ezartzean,  $b = 2,13$  balioa lortu zen (2. taula). *Mytilus galloprovincialis* muskuiluarekin eginiko saiakeran antzeko balioa lortu zen,  $b = 1,91$  (Arranz et al., 2016). Ikerketa honetan, amonioaren ekoizpenaren eta pisu biziaren arteko erlazioa aztertzean,  $b$  baliorako 0,74 lortu zen (3. taula). Bayne eta Newell-en arabera (1983), *Mytilus edulis* muskuiluan  $b$  balioa 0,482 eta 1,480 artean mugi daiteke eskrezioa eta pisuaren arteko erlazioa ezartzean. *Enteractopus megalocyathus* eta *Octopus maya* olagarroetan pisu biziarekin eginiko neurketa alometrikoetan,  $b$  baliorako *O. maya* olagarroan 0,43 eta *E. megalocyathus* olagarroan 0,37 lortu ziren (Farías et al., 2009). Amonioaren ekoizpena ehunen pisu lehorren arabera adieraztean, lan honetan  $b$  baliorako 0,56 lortu zen (4. taula). *Mytilus galloprovincialis*-ekin eginiko saiakeretan antzeko balioa lortu zen baita ere: 0,616 (Arranz et al., 2016). *Pinctada margaritifera* eta *P. maxima* ostretan pisu lehorrekin eginiko saiakeretan ere, 0,79-ko  $b$  balioa lortu zen (Yukihira et al., 1998). Iraizpen-

tasaren eta pisu lehorraren arteko erlazioa ezartzean, oraindik erlazio alometrikoagoa lortu da pisu biziarekin baino. Hots,  $b$  balioa gehiago urruntzen da 1 baliotik. Ondorioz, pisu bizia erabiltzean amonioaren ekoizpena aztertzeke, ez ginateke erlazio egokia erabiltzen egongo.

Esperimentuak iraun zituen 4 hileetan zehar ez zen aldakortasun esangarririk aurkitu (2. taula; 3. taula; 4. taula) aztertutako erlazio alometrikoetan. Izan ere, laborategiko baldintzak eta dieta konstante mantendu ziren prozesu osoan zehar, elikagai edo tenperatura aldakortasunak eragin zitzaizketen aldaketak ekidinez. Hala ere, hainbat ikerketek adierazi dute sasoiak aldaketak eragiten dituztela amonioaren eskrezio-tasan aktibitate metabolikoaren aldaketen ondorioz. Neguan eta udaberrian lortu ziren amonioaren eskrezio-tasa altuenak (Bayne and Scullard, 1977; Gugale et al., 2017). Baina laborategian mantendutako aleetan eginiko epe laburragoko esperimentuetan ez zen amonioaren eskrezio-tasan aldaketa nabaririk behatu (Mann and Glomb, 1978).

*R. decussatus* eta *R. philippinarum* espezieak konparatzean, desberdintasun esangarriak aurkitu ziren pisu totalen, ehunen eta maskorren pisu lehorrean eta kondizio indizean (7. Irudia; 8.irudia eta 9.irudia); nahiz eta tamaina bereko aleak izan. *R. philippinarum* espeziean behaturiko maskorren pisu lehorrak adierazten du maskorraren hazkuntzarako energia asko behar izan zutela. Hau dela eta, kaltzifikazio prozesuan energia gehiago kontsumituko zuten, gastu metaboliko altuagoak izanik. *R. philippinarum* espezieak xurgaturiko energia totaletik maskorraren ekoizpenerako %25-50 ere bideratu dezake (Gardner and Thomas, 1987). *R. decussatus* aleen kasuan ordea, ehun metaboliko aktiboen proportzio erlatiboa askoz ere handiagoa zen txirla japoniarrarekin konparatuz (9.irudia). Ondorioz, maskorraren luzera berbererako, txirla handiaren ehunen pisu lehorra nabariki handiagoa zen.

Amonioari dagokiola, hainbat ikerketek espezieen arteko desberdintasunak frogatu dituzte amonioaren eskrezio-tasan (Farias et al., 2003; Sma and Baggaley, 1976; Yukihiro et al., 1998). Ikerketa honetan ere, bi espezieen artean desberdintasunak lortu ziren amonioaren ekoizpenean. *R. decussatus* aleetan amonioaren eskrezio-tasa baxuagoa lortu zen txirla japoniarraren amonio-ekoizpenarekin erkatuta; eta hau, esan bezala, nahiz eta txirla handiaren kasurako ehun metabolikoki aktiboen proportzioa altuagoa izan (11.irudia). Horrek esan nahi du *R. decussatus* aleen pisu unitateko amonioaren irazpen-tasa japoniarrarena baino askoz ere baxuagoa zela. Bi espezie hauekin eginiko ikerketetan, hala ere, kontrako emaitzak lortu ziren. *R. decussatus* aleetan amonioaren ekoizpen-tasa altuagoak lortu dira *R. philippinarum* aleetan baino (Xie and Burnell, 1995).

## 5. Ondorioak

Laburbilduz, ikertutako txirla japoniarraren populazioa baldintza fisiologiko egokietan zegoen eta beraz, lorturiko erlazio alometrikoak txirla japoniarraren populazio osasuntsu bati dagozkie. Akuakultura zentroetan *I. galbana* algaz elikaturiko *R. philippinarum* txirlen populazioetan aplikatu ahalko litzateke ekuazioak amonioaren eskrezio-tasari buruzko datuak estandarizatzeko. Amonioaren eta luzera, zein pisu biziarekin lorturiko erlazioak zuzenak izan arren, hurbilketak dira, eta beti ere, zuzenena amonioaren eskrezio-tasa ehun metaboliko aktiboen pisuarekin erlazionatzea izango litzateke. Hala ere, akuakultura zentroetan luzera eta pisu bizia erabiltzeak abantailak ditu, neurketa zuzenak baitira bi hauek. Baina luzera eta pisu bizia erabiltzean kontuan izan beharko litzateke kondizio indizea aldakorra dela tamaina bereko aleen artean eta baita ere emendatuz doala tamainarekin batera. Bestetik, haztegiatiko ingurumen baldintzak konstante mantentzen badira, badirudi ez dela aldakortasun esangarririk antzemango amonioaren eskrezio-tasan, eta beraz, lorturiko erlazio alometrikoak momentu oro aplikagarriak izango lirateke. Alometriei dagokionez, lorturiko  $b$  balioak beste hainbat espeziekin eginiko ikerketetan lorturiko balioen antzekoak izan ziren. Hala ere, *R. decussatus* eta *R. philippinarum* aleen erkaketan ikusi bezala, batez besteko amonioaren eskrezio-tasak erabat desberdinak ziren ehunen pisu lehor unitateko. Are gehiago, desberdintasun esangarriak zeuden parametro biometrikoen dagokiola bi espezieen artean. Beraz, txirla japoniarrekin lorturiko erlazio alometrikoak ez luke txirla handiaren populaziorako balioko. Beharrezkoa litzateke *R. decussatus* espeziarentzat amonioaren eskrezio-tasaren eta tamainaren arteko erlazio alometriko bat lortzea.

## Esker onak

Bereziki eskertu nahiko nioke Miren Bego Urrutiari, Animalia Fisiologiako laborategian lan egitea eskaintzeagatik eta proiektuan zehar emandako laguntzagatik. Baita, Udane Arambalzari eta Kristina Arranzeri esperimentazio-fasean zehar tekniken erakusketan eta hobekuntzan emandako laguntzagatik. Datuen tratamendurako Pablo Markaideri eskerrak eman behar dizkiot R programa estatistikoan behar nituen analisi estatistikoak erakusteagatik. Bestetik, laborategian nirekin egon diren ikaskideei esperimentazio egun luzeetan lagunduagatik. Azkenik, Genetika, Antropologia Fisikoa eta Animalien Fisiologiako sailari eta Euskal Herriko Unibertsitateari proiektua garatzeko beharrezkoa izan den materiala eskura jarzteagatik.

## Bibliografía

- Allen, J.A., Garrett, M.R., 1971. The excretion of ammonia and urea by *Mya arenaria* L.(Mollusca: Bivalvia). *Comp. Biochem. Physiol. A Physiol.* 39, 633–642.
- APROMAR, 2016. La Acuicultura en España. España.
- Arifin, Z., Bendell-Young, L.I., 2001. Cost of selective feeding by the blue mussel *Mytilus trossulus* as measured by respiration and ammonia excretion rates. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 260, 259–269.
- Arranz, K., Labarta, U., Fernández-Reiriz, M.J., Navarro, E., 2016. Allometric size-scaling of biometric growth parameters and metabolic and excretion rates. A comparative study of intertidal and subtidal populations of mussels (*Mytilus galloprovincialis*). *Hydrobiologia* 1–15. doi:10.1007/s10750-016-2672-3
- Bayne, B.L., 1971. Oxygen consumption by three species of lamellibranch mollusc in declining ambient oxygen tension. *Comp. Biochem. Physiol. A Physiol.* 40, 955–970. doi:http://dx.doi.org/10.1016/0300-9629(71)90284-2
- Bayne, B.L., Newell, R.C., 1983. Physiological energetics of marine molluscs., in: Saleudin, A.S., Wilbur, K.M. (Eds.), *Physiology, Part I, The Mollusca*. Academic Press, New York, pp. 407–515.
- Bayne, B.L., Scullard, C., 1977. Rates of nitrogen excretion by species of *Mytilus* (Bivalvia: Mollusca). *J. Mar. Biol. Assoc. U. K.* 57, 355–369.
- Beiras, R., Camacho, A.P., Albentosa, M., 1995. Short-term and long-term alterations in the energy budget of young oyster *Ostrea edulis* L. in response to temperature-change. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 186, 221–236.
- Berg, J.M., Tymoczko, J.L., Stryer, L., 2002. Protein Turnover and Amino Acid Catabolism.
- Castro, N.F., de Mattio, N. de V., 1987. Biochemical composition, condition index, and energy value of *Ostrea peulchana* (D'Orbigny): relationships with the reproductive cycle. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 108, 113–126.
- Delgado, M., Pérez Camacho, A., Albentosa, M., 2011. Balance energético en la almeja *Ruditapes decussatus* (Linnaeus, 1758). *Bol. Inst. Esp. Oceanogr.* 18, 301–306.
- FAO, 2016. The state of world fisheries and aquaculture.
- Farias, A., Garcia-Esquivel, Z., Viana, M.T., 2003. Physiological energetics of the green abalone, *Haliotis fulgens*, fed on a balanced diet. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 289, 263–276.
- Farías, A., Uriarte, I., Hernández, J., Pino, S., Pascual, C., Caamal, C., Domínguez, P., Rosas, C., 2009. How size relates to oxygen consumption, ammonia excretion, and ingestion rates in cold *Enteroctopus megalocyathus* and tropical *Octopus maya* octopus species. *Mar. Biol.* 156, 1547.

- Flassch, J.-P., Leborgne, Y., 1994. Introduction in Europe, from 1972 to 1980, of the Japanese Manila clam *Tapes philippinarum* and the effects on aquaculture production and natural settlement, in: Introductions and Transfers of Aquatic Species. Selected Papers from a Symposium Held in Halifax, Nova Scotia, 12-13 June 1990.
- Flye-Sainte-Marie, J., Jean, F., Paillard, C., Ford, S., Powell, E., Hofmann, E., Klinck, J., 2007. Ecophysiological dynamic model of individual growth of *Ruditapes philippinarum*. *Aquaculture* 266, 130–143.
- Gardner, J.P.A., Thomas, M.L.H., 1987. Growth, mortality and production of organic matter by a rocky intertidal population of *Mytilus edulis* in the Quoddy Region of the Bay of Fundy. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 31–36.
- Gosling, E., 2003. Bivalve molluscs. Blackwell Publishing Ltd, Oxford, UK.
- Gugale, P.R., Vedpathak, A.N., Kharache, S.S., 2017. Oxygen consumption, ammonia excretion and O:N ratio of freshwater bivalve *Lamellidens marginalis* during winter with special reference to body size.
- Han, K.N., Lee, S.W., Wang, S.Y., 2008. The effect of temperature on the energy budget of the Manila clam, *Ruditapes philippinarum*. *Aquac. Int.* 16, 143–152.
- Heisterkamp, I.M., Schramm, A., Larsen, L.H., Svenningsen, N.B., Lavik, G., de Beer, D., Stief, P., 2013. Shell biofilm-associated nitrous oxide production in marine molluscs: processes, precursors and relative importance. *Environ. Microbiol.* 15, 1943–1955.
- Helm, M.M., Bourne, N., 2006. Cultivo de bivalvos en criadero: un manual práctico. Food & Agriculture Org.
- Hemachandra, S.T., Thippeswamy, S., 2008. Allometry and condition index in green mussel *Perna viridis* (L.) from St Mary's Island off Malpe, near Udupi, India. *Aqua Res* 39, 1747–1758.
- Hochachka, P.W., Darveau, C.A., Andrews, R.D., Suarez, R.K., 2003. Allometric cascade: a model for resolving body mass effects on metabolism. *Comp Biochem Physiol* 134.
- Hochachka, P.W., Somero, G.N., 2001. Biochemical Adaptation: Mechanism and Process in Physiological Evolution. Oxford University Press, Oxford.
- Kleiber, M., 1932. Body size and metabolism. *ENE* 1.
- Langton, R.W., Haines, K.C., Lyon, R.E., 1977. Ammonia-nitrogen production by the bivalve mollusc *Tapes japonica* and its recovery by the red seaweed *Hypnea musciformis* in a tropical mariculture system. *Helgoländer Wiss. Meeresunters.* 30, 217.
- Lauritsen, D.D., Mozley, S.C., 1989. Nutrient excretion by the Asiatic clam *Corbicula fluminea*. *J. North Am. Benthol. Soc.* 8, 134–139.
- Lucas, A., Beninger, P.G., 1985. The use of physiological condition indices in marine bivalve aquaculture. *Aquaculture* 44, 187–200.

- Mann, R., Glomb, S.J., 1978. The effect of temperature on growth and ammonia excretion of the Manila clam *Tapes japonica*. *Estuar. Coast. Mar. Sci.* 6, 335–339.
- Marin, M.G., Moschino, V., Deppieri, M., Lucchetta, L., 2003. Variations in gross biochemical composition, energy value and condition index of *T. philippinarum* from the Lagoon of Venice. *Aquaculture* 219, 859–871.
- Ministerio del Medio Ambiente y el Medio Rural Marino, s.f.; FAO, 2015.
- Munari, C., Mistri, M., 2007. Effect of copper on the scope for growth of clams (*Tapes philippinarum*) from a farming area in the Northern Adriatic Sea. *Mar. Environ. Res.* 64, 347–357.
- Paillard, C., Maes, P., 1994. Brown ring disease in the Manila clam *Ruditapes philippinarum*: establishment of a classification system. *Dis. Aquat. Organ.* 19, 137–146.
- Rainer, J.S., 1992. A comparison of methods for calculating condition index in eastern oyster, *Crassostrea virginica* (Gmelin, 1791). *J Shellfish Res* 11, 55–58.
- Rubner, M., 1883. Über die Einfluss der Körpergrösse auf Stoff und Kraftwechsel. *Z Biol* 19.
- Schmidt-Nielsen, K., 1997. *Animal physiology: adaptation and environment*, 5th ed. ed. Cambridge University Press, New York, USA.
- Sma, R.F., Baggaley, A., 1976. Rate of excretion of ammonia by the hard clam *Mercenaria mercenaria* and the American oyster *Crassostrea virginica*. *Mar. Biol.* 36, 251–258.
- Solórzano, L., 1969. Determination of ammonia in natural waters by the phenylhypochlorite methods 1 1. This research was fully supported by U.S. Atomic Energy Commission Contract No. ATS (11-1) GEN 10, P.A. 20. *Limnol. Oceanogr.* 14, 799–801. doi:10.4319/lo.1969.14.5.0799
- Tamayo, D., Ibarrola, I., Urrutia, M.B., Navarro, E., 2011. The physiological basis for inter-individual growth variability in the spat of clams (*Ruditapes Philippinarum*). *Aquaculture* 321, 113–120.
- Urrutia, M.B., Ibarrola, I., Iglesias, J.I.P., Navarro, E., 1999. Energetics of growth and reproduction in a high-tidal population of the clam *Ruditapes decussatus* from Urdaibai Estuary (Basque Country, N. Spain). *J. Sea Res.* 42, 35–48.
- Warren, C.E., Davis, G.E., 1967. *Laboratory studies on the feeding, bioenergetics, and growth of fish*. Oregon State University.
- Willmer, P., Stone, G., Johnston, I., 2009. *Environmental physiology of animals*. John Wiley & Sons.
- Winberg, G.G., 1956. Rate of metabolism and food requirements of fishes. *Fish Res Bd Can Trans Ser* 194, 1–202.
- Xie, Q., Burnell, G.M., 1995. The Effect of Activity on the Physiological Rates of Two Clam Species, *Tapes philippinarum* (Adams & Reeve) and *Tapes decussatus* (Linnaeus). *Biol. Environ. Proc. R. Ir. Acad.* 95B, 217–223.



Yukihira, H., Klumpp, D.W., Lucas, J.S., 1998. Effects of body size on suspension feeding and energy budgets of the pearl oysters *Pinctada margaritifera* and *P. maxima*. Mar. Ecol. Prog. Ser. 119–130.

Zar, J.H., 1984. Bioestatistical analysis, 4th ed. Prentice Hall, Englewood.