



III. IKERGAZTE

NAZIOARTEKO IKERKETA EUSKARAZ

Kongresuko artikulu-bilduma

ZIENTZIAK ETA NATURA ZIENTZIAK

2019ko maiatzaren 27, 28 eta 29
BAIONA, EUSKAL HERRIA





(c) 2019 Udako Euskal Unibertsitatea (UEU)

Paueko eta Aturrialdeko Unibertsitatea, Euskal Herriko Unibertsitatea (UPV/EHU), Nafarroako Unibertsitateko Publikoa, Mondragon Unibertsitatea (MU), Deustuko Unibertsitatea (DU), Nafarroako Unibertsitatea eta ESTIA laguntzaileak izan dira edizio honetan.

(c) Egileak

Editoreak:

Olatz Arbelaiz, Urtzi Etxeberria, Ainhoa Latatu, Miren Josu Omaetxebarria

Artikuluak *Creative Commons Aitortu-PartekatuBerdin 3.0* lizentziapean daude

ISBNa: 978-84-8438-681-0 Lan osorako

ISBNa: 978-84-8438-685-8 4. liburukia

DOI: <https://dx.doi.org/10.26876/ikergazte.2019.04>

Harremanetarako: argitalpenak@ueu.eus

UEU. Erribera 14 1 D. 48005 Bilbo. Tel.: 94 679 05 46

ZIENTZIAK ETA NATUR ZIENTZIAK

Aurkibidea

Hitzaurrea.....	5
Batzordeak.....	7
Zulaketa bidezko erresistibitate neurketen simulazioa problema errealean ebazpenean, <i>Jon Ander Rivera González, Elisabete Alberdi Celaya eta David Pardo</i>	11
Ingeniaritzan geometria lantzerantz bideratutako planteamendu baten azterketa eta gauzatzea, <i>Irantzu Alvarez Gonzalez, Elisabete Alberdi Celaya, Maria Isabel Eguia Ribero, Paulo Etxeberria Ramirez, Maria Jose Garcia Lopez eta Judit Muñoz-Matute</i>	16
Espazio-denborako EFMaren eta lerroen metodo esplizituen arteko baliokidetasuna: egonkortasun-baldintza, <i>Judit Muñoz-Matute, Elisabete Alberdi Celaya, David Pardo eta Victor Manuel Calo</i>	23
Piriniotako muturluzearen (<i>Galemys pyrenaicus</i>) ekologia eta emari ekologikoen berrikuspena, <i>Amaiur Esnaola, Jorge González-Esteban, Arturo Elosegi eta Joxerra Aihartza</i>	30
Saguzarren izurriekiko zaletasuna mahasti-sistema batean: kontrol biologikorako oinarritzko hastapenak, <i>Unai Baroja, Inazio Garin, Joxerra Aihartza, Nerea Vallejo, Miren Aldasoro eta Urtzi Goiti</i>	37
Alkoxisilanoz eraldatutako emultsio kopolimeroen bilakaera biltegiatzean zehar, <i>Aitor Barquero, Amaia Agirre, Jose Ramon Leiza eta María Jesús Barandiaran</i>	44
Forma-memoria materialak ezagutzen, <i>Antonio Veloso, José Manuel Laza eta José Luis Vilas</i>	52
Euskal kostako estuarioetan bertakoa ez den zooplanktonaren eraginaren analisia, <i>Ziortza Barroeta Ibon Uriarte, Fernando Villate eta Arantza Iriarte</i>	58
Bizkaiko Golkoko antxoaren energia-baliabideak: populazioaren dinamikan eragiten duten prozesu nagusietan dituzten ondorioak, <i>Estibalitz Txurruka, Unai Cotano eta Fernando Villate</i>	66
Ur gazte frakzioa ibai-arro mediterraneo batean: gainazaleko urak datatzeko metodologia berri baten aplikazioa (Vallcebre Ikerketa Arroak, Pirineoen HE-a), <i>María Valiente, Francesc Gallart, Pilar Llorens eta Jérôme Latron</i>	74
Euskal Herriko ferra-saguzarren dieten gainezarpenera, <i>Miren Aldasoro, Joxerra Aihartza, Aitor Arrizabalaga-Escudero, Urtzi Goiti, Unai Baroja, Nerea Vallejo eta Inazio Garin</i>	81

Harrapakinen partiketa ehizamolde ezberdineko saguzarretan: <i>Plecotus austriacus</i> (Fisher, 1829) eta <i>Hypsugo savii</i> (Bonaparte, 1837) espezieen kasua, <i>Nerea Vallejo, Carlos Ibañez, Jesus Nogueras, Aitor Arrizabalaga-Escudero eta Inazio Garin</i>	91
Konpostajearen ahalmena crocosmia X crocosmiflora (Lemoine)ren propaguluak desbitalizatzeko, <i>Iñaki Etxeberria, Gorka A. Izurzu, Joseba S. Arizmendiarieta eta Natxo Irigoien</i>	96
Hutsune erako Akatsen Azterketa Ni-Mn-Z (Z=Ga,Sn,In) Aleazioetan, <i>Iraultza Unzueta Solozabal, Nerea Zabala Unzalu, Vicente Sanchez Alarcos Gomez, Vicente Recarte Callado, Iñaki Pérez de Landazabal, Jose Angel Garcia Martinez eta Fernando Plazaola Muguruza</i>	102
Tentsio altuko katodoak geruza meheko litio-ioi baterietarako, <i>Iñaki Madinabeitia, Jokin Rikarte, Giorgio Baraldi, Ane Etxebarria, Alberto Garcia, Francisco Fernandez eta Miguel Ángel Muñoz</i>	110
Brownmilleritaren $\text{Ca}_2\text{AlFeO}_5$ propietate elastikoak, <i>Xabier M. Aretxabaleta, Hegoi Manzano eta Iñigo Etxebarria</i>	116
Ekialdeko Kantauriar Itsasoko kostaldeko partikula exopolimeriko gardenen (PEG) urtean zeharreko bilakaera, <i>Ainhoa Uranga, Naiara Abad, Iñigo Azua, Itxaso Artolozaga, Zuriñe Baña, Marian Unanue eta Begoña Ayo</i>	123
Kukutxeztula: gaitz zaharrarentzako konponbide berrien bila, <i>Xabier Fernandez-Martinez, Jone Amuategi, David González-Bullón, Kepa Belloso-Urbe eta Helena Ostolaza</i>	130
Mikrofonien monitorizazio eta kontrola RF kabiteteetan, <i>Ander Elejaga, Josu Jugo eta Inari Badillo</i>	138
Onddo harizpitsuen garapenaren erregulazioan parte hartzen duten transkripzio faktoreen dinamika zelularra, <i>Ainara Otamendi, Elixabet Perez-de-Nanclares-Arregi, Elixabet Oiartzabal, Marc S. Cortese, Eduardo A. Espeso eta Oier Etxebeste</i>	145
Aktibitate antiproliferatiboa duten konposatu heterozikliko fosforodunen prestaketa: I topoisomerasaren inhibitzaile berrien diseinua, sintesia eta ebaluazio biologikoa, <i>Asier Selas, Concepción Alonso, Gloria Rubiales eta Francisco Palacios</i>	153

IKERGAZTE 2019

Nazioarteko Ikerketa Euskaraz

HITZAURREA

Duela 45 urte sortu zenetik, euskal komunitate zientifiko-intelektuala trinkotzea da UEUk duen helburu garrantzitsuenetakoa bat. Elkarren berri izatea ezinbestekoa da ezagutzak aurrera egin dezan, are gehiago gure kasuan, euskaraz lanean dihardugun ikertzaileak hain sakabanatuta egonda. Ildo horretatik, UEUk hainbat arlotako adituak bildu izan ditu zenbait ekimenetan azken hamarkadetan: Informatikari Euskaldunen Bilkurak (11 edizio) Historialari Euskaldunen Topaketak (5 edizio), Hizkuntzalari Euskaldunen Bilkura (3 edizio), Matematikari Euskaldunen Bilkura (3 edizio), Osasun Zientzietako eta Natur Zientzietako ikertzaileen bilkurak (3 edizio), besteak beste, horren adibide argiak dira.

Bilkura guzti horiei IkerGazte kongresua gehitu zitzaien 2015.eko maiatzean. Ikerketa, euskara, gazteak, disziplinarrekotasuna izan ziren bilgune haren osagai nagusiak. Durangon hasitako bideak, jarraipena izan zuen 2017.ean Iruñean. Eta heldu da 2019.a eta aurtengoan Baiona dugu topagune; maiatzaren 27, 28 eta 29an, Paueko eta Aturrialdeko Unibertsitatean, Errobiko Campusean (Université de Pau et des Pays de l'Adour, Campus de la Nive) elkartuko gara. Hirugarren edizio honek 2015.ean ziurgabetasun handiz hasitako bideak nolabaiteko oinarri sendoa baduela erakusten digu. Eta aurten, beste behin ere, ikergazteen eskutik jasotako ekarpen kopuruak IkerGazte behar beharrezkoa dela ematen digu aditzera.

“IkerGazte2019: Nazioarteko Ikerketa Euskaraz” goiburu duen kongresu horren artikulu-bilduma dugu hau. Izenburu honetan Ikerketa, Euskara eta Gaztetasuna bildu nahi izan ditugu. Ikusgarri egin nahi dugu Euskal Herriko ikertzaile gazteek egiten duten nazioarte mailako ikerketa. Maiz nazioartean erakutsi eta aurkezten dira lan horiek, Euskal Herrian eta euskaraz aurkezteko aukera izan gabe. Kongresu honen helburua komunitate-zientifiko euskaldunaren ikertzaileak bildu eta elkarren berri izatea da, arlo guztiak jorratuz; hasi humanitateetatik eta gizarte-zientzietatik, eta zientzia zehatz, natur zientzia, ingeniari, arkitektura eta osasun-arloetako gaietaraino. Nazioartean ingelesez argitaratu ohi diren lanak euskaraz ere argitaratzeko eta zabaltzeko aukeraren aldeko apustua da. Hirugarren edizio hau euskaraz egindako ikerketan mugari dela dakigu!

Honelako kongresu bat aurrera ateratzeko ezinbestekoa da bai banakoen lan eskerga, baita erakunde publiko eta pribatu ugariaren laguntza ere: UEUko lan-taldea, Iparraldeko Sostengu Taldea eta UEUkideak; Batzorde Zientifikoko ikertzaileak eta Batzorde Dinamizatzaileko ikergazteak; Unibertsitate eta Ikertalde laguntzaileak; aldizkari zientifikoak eta bestelako laguntzaileak. Aurten azpimarratzekoak dira IKER Euskara eta euskal testuen ikerketa-zentroaren aldetik eta Paueko eta Aturrialdeko Unibertsitatearengandin (UPPA) jasotako interesa eta babesa. Bestalde, Baionako Udalak eta Udalbiltzak sariak babestu dituzte. Horrez gain, hainbat pertsonak eta komunikabidek erakutsitako atxikimendua ere aipatu nahi dugu. Esker mila guztiei.

Egitarau interesgarri eta erakargarria da, arlo guztietako ekarpenak biltzen dituen; 49 ahozko aurkezpenak dira eta 53 poster modukoak. Guztira 102 komunikazio.

Hasieran, 111 komunikazio jaso ziren, baina gainbegiratze-prozesua gainditu ondoren 102 daude bilduma honetan.

Jakintza-arloei dagokionez hauek dira zenbakiak:

Giza Zientziak eta Arteak	19
Gizarte Zientziak eta Zuzenbidea	19
Zientziak eta Natura Zientziak	21
Ingeniaritza eta Arkitektura	20
Osasun Zientziak	23

Ikertzaileen filiazioari dagokionez, espero bezala, Euskal Herriko Unibertsitatea (UPV/EHU) da maizen aipatu dena, 76 ekarpenekin. Ondoren Mondragon Unibertsitatea (5 ekarpen), Nafarroako Unibertsitate Publikoa (4 ekarpen) eta Nafarroako Unibertsitatea (4 ekarpen) aurkitzen ditugu maizen. Paueko Unibertsitatetik ere 3 ekarpen bat egon dira, eta IKER ikerketa-zentrotik eta Bordeleko Unibertsitatetik, bana. Beste ekarpen batzuk ere ondoko unibertsitatetatik jaso dira: Bartzelonako Unibertsitatea, Madrigal Unibertsitate Publikoa eta Birmingham City University.

Unibertsitateei loturiko ikerketa-zentroak eta taldeak aipatzen dira ekarpenetako askotan, beheago aipatzen diren Ikertalde laguntzaileez gain, PIE, NU-Cima, NU-Tecnun, INAMAT Institutua, BioCruces Osasun Ikerketa Institutua, BCMaterials, Polymat, AZTI-Teknalia, Instituto de Diagnóstico Ambiental y Estudios del Agua (IDAEA-CSIC), Estación Biológica de Doñana (CSIC), Ikerlan, chucarro Basque Center for Neuroscience edo CIC-energyGUNE agertzen dira besteak beste. Euskaltzaindia eta Gipuzkoako Foru Aldundia ere izan dira ikerketagune.

Euskal Herritik kanpoko erakundeei dagokienez, hauek dira lankidetzan aipatzen diren unibertsitate batzuk: Université de Toulon, UEU, Begoñako Andra Mari, Curtin University, Mineral Resources, Commonwealth Scientific and Industrial Research Organisation (CSIRO), Institut de Biologie Paris Seine (NPS – IBPS).

Eta bi urtean behin errepikatzeari eutsiko diogu. Beraz, adi, Ikergazte2021 etorriko da-eta!

Olatz Arbelaitz, Urtzi Etxeberria, Ainhoa Latatu eta Miren Josu Omaetxebarria

BATZORDEAK

Batzorde Zientifikoa

Batzordeburua:

Miren Josu Omaetxebarria (UPV/EHU, UEU)

Urtzi Etxeberria (IKER Euskara eta euskal testuen ikerketa-zentroa)

Koordinatzailea:

Olatz Arbelaitz (UPV/EHU, UEU)

Idazkaria:

Ainhua Latatu (UEU)

Giza Zientziak eta Arteak

Itziar Aduriz (Bartzelonako Unibertsitatea, UEU)

Garazi Arrula (UPV/EHU, UEU)

Haizea Barcenilla (UPV/EHU, UEU)

Aritz Irurtzun (CNRS-IKER, UEU)

Kepa Korta (UPV/EHU)

Aitzpea Leizaola (UPV/EHU, UEU)

Elizabete Manterola (UPV/EHU, UEU)

Ismael Manterola (UPV/EHU, UEU)

Alazne Porcel (UPV/EHU)

Blanca Urgell (UPV/EHU)

Gizarte Zientziak eta Zuzenbidea

Josu Amezaga (UPV/EHU, UEU)

Aitor Bengoetxea (UPV/EHU, UEU)

Eneko Bidegain (MU, UEU)

K. Josu Bijuesca (Deustuko Unibertsitatea)

Lore Erriondo (UPV/EHU, UEU)

M^aLuz Esteban (UPV/EHU, UEU)

Mikel Iruskieta (UPV/EHU, UEU)

Xabier Landabidea (Deustuko Unibertsitatea, UEU)

Ixusko Ordeñana (UPV/EHU)

Iñaki Peña (Deustuko Unibertsitatea)

Zientziak eta Natur Zientziak

Elizabete Alberdi (UPV/EHU, UEU)

Arantza Aldezabala (UPV/EHU, UEU)

Estibaliz Apiñaniz (UPV/EHU, UEU)

Arturo Apraiz (UPV/EHU, UEU)

Itziar Aretxaga (INAOE)

Inmaculada Arostegui (UPV/EHU, UEU)

Jose Miguel Campillo (UPV/EHU, UEU)

Arturo Elosegi (UPV/EHU, UEU)

Nestor Etxebarria (UPV/EHU, UEU)

Maite Insausti (UPV/EHU)

Kizkitza Insausti (NUP)

Marian Iriarte (UPV/EHU)

Natxo Irigoien (NUP)

Josu Jugo (UPV/EHU, UEU)

Ingeniaritza eta Arkitektura

Gorka Azkune (Deustuko Unibertsitatea)
Haritza Camblong (UPV/EHU, ESTIA, UEU)
Unai Fernandez de Betoño (UPV/EHU, UEU)
Igor Peñalva (UPV/EHU)
Olatz Perez de Viñaspre (UPV/EHU, UEU)
Maialen Sagarna (UPV/EHU)
Ane Sarasola (UPV/EHU)
Arkaitz Zubiaga (University of Warwick)

Osasun Zientziak

Rafael Aldabe (CIMA, NU)
Jose Ramon Bilbao (UPV/EHU, Gurutzetako Ospitalea)
Koldo Callado (UPV/EHU, UEU)
Izaskun Elezgarai (UPV/EHU, UEU)
Felix Elortza (Biogune, UEU)
Karlos Ibarguren Olalde (Osakidetza)
Xabier Isasi (UPV/EHU, UEU)
Nerea Osinalde (UPV/EHU)
Izortze Santin (UPV/EHU)

Beste gainbegirale batzuk

Bakarne Altonaga (UPV/EHU, UEU)
Ander Altuna (UEU)
Noelia Andollo (UPV/EHU)
Aritz Bilbao (Deustuko Unibertsitatea)
Unai del Burgo (UPV/EHU, UEU)
Ibon Cancio (UPV/EHU, UEU)
Idoia Fernandez (UPV/EHU, UEU)
Vanessa García (UPV/EHU)
Unai Lopez-Novoa (Cardiff University)
Jose Martin (UPV/EHU, UEU)
Iñigo Mendialdua (UPV/EHU)
Bea Narbaiza (UPV/EHU)
Jose Antonio Pascual (UPV/EHU)
Igor Rodriguez (UPV/EHU)
Josean Rodriguez (UPV/EHU)
Ainara Sagarna (UPV/EHU)
Itziar San Martin (UPV/EHU, UEU)
Ander Soraluze (UPV/EHU, UEU)
Joseba Zalakain (Siis, Dokumentazio eta Ikerketa Zentroa)
Jon Zarate (UPV/EHU)
Mario Zubiaga (UPV/EHU, UEU)

Batzorde Dinamizatzailea

Haizpea Abrisketa (CNRS-IKER Euskara eta euskal testuen ikerketa-zentroa)
Begoña Altuna (UPV/EHU)
Joseba Fernandez de Landa (UPV/EHU)
Pauline Guelle (UPPA, IUV, UPV/EHU)
Nagore Elu (UPV/EHU)

Batzorde Teknikoa

Ane Sarasua (UEUko Idazkari nagusia)

- Idoia Torregarai (komunikazio arduraduna)
- Ainhoa Latatu (koordinatzaile akademikoa)
- Ander Altuna (hizkuntza zuzentzailea)

Ikerketa-talde laguntzaileak

- ELEBILAB. UPV/EHUren Elebitasunaren Laborategia.
- UPV/EHUko hizkuntzaren tratamendu automatikoaren inguruko IXA Ikerketa Taldea
- UPV/EHUko “Jokabidearen Ekologia eta Eboluzioa” ikerketa taldea.
- NOR. UPV/EHUko Ikus-entzunezko Komunikazio eta Publizitate Saileko Ikerketa Taldea.
- UPV/EHUko Neuropsikofarmakologia ikerketa taldea.
- UPV/EHUko Sinapsi-neuroanatomiaaren ultraegitura eta funtziorako laborategia.

Aldizkari zientifiko laguntzaileak

- ALDIRI. Arkitekturaren inguruko adizkaria
- BAT. Soziolinguistikan eta glotopolitikan espezializatutako aldizkaria.
- EKAIA. Euskal Herriko Unibertsitateko zientzia eta teknologi aldizkaria da.
- ELHUYAR ZIENTZIA ETA TEKNOLOGIA aldizkaria.
- JAKIN. Giza eta gizarte-zientzien alorreko kultur aldizkaria.
- OSAGAIZ. Osasun zientzien aldizkaria
- SENEZ. EIZIE elkarteak kudeatzen duen itzulpengintzako arloko aldizkaria.
- UZTARO. UEUk kudeatzen duen giza eta gizarte-zientziei buruzko aldizkaria.

Hizlari gonbidatuak

- Francesco d’Errico, CNRS-Bordeleko Unibertsitatean Ikerketa Zuzendaria eta Bergeneko Unibertsitatean irakaslea.
- Jesus Mari Txurruka, UPV/EHUko irakasle eta ikertzailea izandakoa. UEUkidea.
- Gwerfyn Wyn Roberts, Galeseko Bangor University-ko School of Health Sciences-eko irakasle titularra izandakoa.
- Josu Martinez, UPV/EHUko ikus-entzunezko Komunikazio saileko ikerlari eta irakaslea da, zinema arloan.

Tailerrak

- «Artikuluak, tesia eta bestelako dokumentu zientifikoak sortu LaTeXekin». Igor Ruiz Agundez. BilbaoTIK – Bilboko Udalaren Informatika Zentroa.
- «Prozedura feministak: ezagutza, ikerketa eta herrigintza». Miren Aranguren. Emagin Formazio eta Ikerketa Feminista Elkarteko kidea eta ikerketa proiektuen arduraduna.
- «Argitalpen zientifikoetarako mapen sorkuntza». Pili Martinez eta Aitor Bastarrika. Geomatika Aplikatua Ikerketa Taldeko partaideak eta UPV/EHUko Geoinformatikako Berezko Tituluko irakasleak.
- HITZALDIA: 1757ko lapurterazko gutunak: jarraipena. Xarles Bidegain. Paueko eta Aturrialdeko Unibertsitatean Euskal Literatura eta Euskal Mintzairako katedraduna, euskaltzain eta ikertzailea.
- Datuak ikusarazteko, Infografia. Joxan Apeztegia. BERRIAko infografista.
- Ikerkuntzan kontuan hartu behar diren gako juridikoak. Ion Turrillas. IKT abokatua, UPV/EHU.
- Zelan aletu zure ikerketa akademiatik harago. Uxune Martinez. Euskampus Fundazioko Kultura Zientifikoko eta Berrikuntza Unitateko Zabalkunde Zientifikorako arduraduna.

- Tailer-bisitak:
 - Euskal Herriko Laborantza Ganbara.
 - ESTIA Ingeniaritza Eskola.

Mahai-ingurua

«Baxoaren ondotik zer? Nazio garapenerako giltzak». Gidaria: Pauline Guelle (UPPA, IUV, UPV/EHU).

Zulaketa bidezko erresistibitate neurketen simulazioa problema errealen ebazpenean

Rivera González, Jon Ander¹; Alberdi Celaya, Elisabete² eta Pardo, David^{1,2,3}

¹ Basque Center for Applied Mathematics (BCAM), Bilbao

² Euskal Herriko Unibertsitatea (UPV/EHU)

³ IKERBASQUE, Basque Foundation for Science, Bilbao

riverajonander@gmail.com

Laburpena

Lan honetan zulaketa bidezko erresistibitate neurketen simulazioan zentratuko gara. Gure abiapuntua (Pardo eta Torres-Verdin (2015)) lanean garatutako simulaziorako eta inbertsiorako metodoa izango da, non 3D-ko problema bat 1D-ko ondoz ondoko ereduaren segida bezala deskonposatzen den. Helburua inbertsio-prozesua hobetzea izanik, tresnaren posizio bakoitzerako hiru geruza eta zazpi aldagai onartzen dituen inbertsio metodoa garatuko dugu. Metodo berriari inbertsio murriztua deituko diogu. Garatutako metodo berri honek besteak beste petrolioaren erauzketa hobetzeko balioko du.

Hitz gakoak: alderantzizko problemak, zulaketa bidezko erresistibitate neurketak

Abstract

In this work, we will focus on the simulation of borehole recordings. Our departure point is the inversion method developed in (Pardo eta Torres-Verdin (2015)). In this method a 3D problem is decomposed in a sequence of 1D problems. In order to improve the inversion, we develop a method that assumes three layers and seven variables per logging position, which is called the restricted mode inversion. This new inversion method can be used to improve the extraction of oil.

Keywords: inverse problem, borehole resistivity measurements

1. Sarrera eta motibazioa

Petrolio ingeniariaritzan lanetan erabilitako neurketa geofisikoen helburu nagusietako bat lur azpiko mapa bat sortzea da. Modu honetan petrolio eta gas erreserben bilaketa eta erauzketa optimiza daitezke. Lur azpia hainbat materialen osatuta dago. Ohikoena mineralak dauzkaten harri porotsuak aurkitzea da, non harri hauek ur gaziz edota hidrokarburoz beteta dauden. Material hauek lur azpian sortzen dituzten egiturak gehienetan irregularrak dira, hau da, gailur asko eta ebakidura bortitzak dituzte. Are gehiago, lur azpia osatzen duten geruzek ez dute lurraren partiketa homogeneo bat osatzen, ezaugarri eta propietate ezberdinetako materialak nahastuta baitaude.

Lur azpiko osaketa hauek guztiak identifikatzeko neurketa geofisikoak erabili behar izaten dira. Zultzen ari garen bitartean erregistroak jasotzeko (*Logging-While-Drilling*, LWD) tresna berriak garatu diren ezker, *geosteering*-a izeneko teknikaren erabilera posiblea izan da hidrokarburoen lorpena hobetzeko. Geosteering hitzak esan nahi du, putzuaren ibilbidea zuzendu egiten dela zulaketa egiten ari garen bitartean lortutako datuen interpretazioan (inbertsioan) oinarrituz. Baina lanerako aukera berri honek arazo bat ere ekarri du hidrokarburoen industriara: datuak denbora errealean interpretatzeko (alderantzizatzeko edo inbertitzeko) beharrezkoak, hain zuzen.

LWD tresnek igorleak eta hartzaileak dituzte instalatuta. Tresna horien ezaugarri bereizgarria igorleen eta hartzaileen arteko distantzia da. Distantzia hau txikia da (gehienez 2 metrokoa), eta ondorioz, putzutik hurbil lortutako neurketen zehaztasuna hobea izaten da. Bestalde, igorleen eta hartzaileen arteko distantzia handitu beharra dago putzutik urrun egindako neurketen zehaztasuna ona izatea nahi badugu. Hori lortzeko aukera bat GEO tresnak erabiltzea da. Igorleek igortzen dituzten uhin elektromagnetikoek lur azpiko materialetan talka egiten dute, eta materialaren arabera era ezberdinetan errebotatzen dute. Hartzaileek informazio hau jasotzen dute. Prozesu

hau zuloa erauzten ari garen bitartean burutzen da. Neurketa hauen interpretazio egokiak lur azpiko propietate elektromagnetikoak egoki zehaztea ahalbidetzen du, era honetan, lur azpiko mapa egoki bat lortuz.

2. Arloko egoera eta ikerketaren helburuak

Lur azpia hainbat geruzaz osatuta dago eta LWD teknikaren bidez lortutako informazioa erabiliz lur azpiko mapa bat berreskuratu nahi dugu. Bereziki, uraren eta petrolioaren arteko kontaktua da modelizatu nahi duguna. Modelizazio hau ondo egitea ezinbestekoa da, izan ere, putzuaren ibilbidea urez inguratuta dauden haitzetan zehar ekidin nahi baita. Zulaketa tresnak ura ukituko balu, putzua urez beteko litzateke eta honek gastu gehigarri handiak eragingo litzuke.

Petrolio industrian lan egiteko aukera berri honek datuen interpretazioa (inbertsioa) denbora errealean eskatzen du. *Geosteering* teknika burutzeko 3D-ko problema bat ebatzi behar da. Hidrokarburoen industrian putzuetako erresistibitateak neurtzeko hiru dimentsiotako zenbait zenbakizko simulagailu garatu izan dira azken hamarkadetan (Avdeev *et al.*, 2002; Davydycheva *et al.*, 2003), baina simulagailu hauek oso motelak dira denbora errealean lan egiteko. Arazo honi aurre egiteko 3D-ko problemaren konputazio-kostua murrizten duten teknikak garatu dira. Teknika berri hauetako batzuek problemaren dimentsioaren murrizketan oinarritzen dira.

Pardok eta beste zenbait autorek LWD tresna baten bidez lortutako neurketa elektromagnetikoak erabiliz dimentsio bakarreko geruzetan (1D) erresistibitate elektrikoa balioztatzen duen 1.5D inbertsio algoritmo bat garatu dute (Pardo eta Torres-Verdin (2015)). 1.5D eredu bat esaten dugunean, 3D-ko datuak dituen 1D-ko eredu bat esan nahi da. Eszenatoki honek 1D-ko problema independenteen segida bati bide ematen dio, eta LWD tresnaren bidez lortutako neurketak erabiliz geruzen erresistibitate elektrikoa estimatzen du. Honekin batera, problemaren ebazpenerako konputazio-kostu gutxiago duen metodo erdi-analitiko bat ere garatu dute. Putzuetako erresistibitate problemak ebazteko beste zenbait 1.5D metodo ere garatu izan dira (Wildes *et al.*, 1997; Gyulai eta Ormos, 1999). Aipatzekoak dira bereziki, 2.5D metodoak (Rodriguez-Rozas *et al.*, 2017; Abubakar *et al.*, 2008). Metodo hauek 3D-ko datuak erabiltzen dituzte materialen 2D-ko banaketa daukaten problemak ebazteko. 2.5D simulagailuek 1.5D simulagailuek baino emaitza zehatzagoak eskaintzen dituzten arren, 1.5D simulagailuek baino denbora gehiago behar dute denbora errealean inbertsioak egiteko, eta kasu batzuetan, inplementatzeko zailak dira.

Beraz, oraindik ez da existitzen soluzio zehatzak arrazoizko denboran eskaintzen dituen inbertsiorako metodorik. Zulaketa bidez jasotako datuak interpretatzeko metodo egoki baten garapena konputazio kostua gutxitzetik (1.5D metodoak egiten duen bezala) eta emaitza errealak eskaintzetik (2.5D metodoak egiten duen bezala) etor daiteke.

3. Ikerketaren muina

Ebatziko dugun alderantzizko problemaren, $\mathcal{T}$ ibilbidean zehar lortutako $\mathcal{M}$ neurketak izanik, lur azpiko eroankortasunen ($\sigma = \frac{1}{\rho}$) mapa bat lortu nahi dugu, non eroankortasun hauei dagozkien balioak $\mathcal{M}$ neurketen antzekoak diren.

Alderantzizko problema hau adierazteko, lehenik eta behin kostu funtzionala definituko dugu (Pardo eta Torres-Verdin (2015)) erreferentzian bezala :

$$C_W(s) = \|\mathbf{H}(s) - \mathcal{M}\|_{l_{W_M}^2}^2 + \lambda \|s - s_0\|_{L_{W_{s_0}}^2}^2, \quad (1)$$

- $l_{W_M}^2$ eta $L_{W_{s_0}}^2$, l_2 norma diskretuak eta L_2 norma jarraitua izanik, hurrenez hurren.
- s , erresistibitatearen (ρ) menpeko aldagaia da: $s = s(\rho)$.
- $\mathcal{M}$, tresnaren bidez lortutako neurketak.
- $\mathbf{H}(s)$, s -ren balio baterako simulatutako neurketak.
- λ , soluzio egonkorak lortzea ahalbidetzen duen erregularizazio parametroa.
- s_0 , s -ren hasierako banaketa.

Alderantzizko problemaren soluzio bezala kostu funtzionala minimizatzen duen erresistibitateen banaketa, ρ_i^* , hartuko dugu

$$\rho^* := \arg \min_{\rho} C_W(s(\rho)). \quad (2)$$

3.1. Alderantzizko problemaren diskretizazioa

Alderantzizko problemaren diskretizazioa metodo berri bat erabiliz egin dugu. Horrela, zazpi aldagai kontsideratu ditugu gure problema diskretizatzeke:

- Une bakoitzean gauden geruzako erresistibitate horizontala eta bertikala: ρ_h, ρ_v .
- Goiko eta beheko geruzen erresistibitateak: ρ_u, ρ_l .
- Tresnatik goiko eta beheko geruzetara dauden distantziak: d_u, d_l .
- Geruzen horizontalarekiko angelua: β .

3.2. Inbertsio metodoa: Gradientean oinarritutako metodoa

Aurretik ere esan dugun bezala, gure helburua kostu funtzionala minimizatzea da. Horretarako, kostu funtzionalaren adierazpena deribatu eta zerorekin berdinduko dugu. Bestalde, gure aldagaien balioak kalkulatzeko hurrengo iterazio-eskema erabiliko dugu:

$$s(\boldsymbol{\rho}^{(n+1)}) = s(\boldsymbol{\rho}^{(n)}) + \delta s(\boldsymbol{\rho}^{(n)}), \quad (3)$$

n goi indizea iterazio zenbakia izanik, eta $\delta s(\boldsymbol{\rho}^{(n)})$, n . iterazioan soluzioaren balioan daukagun gehikuntza. Notazioa era honetan sinplifikatuko dugu:

$$s^{(n)} := s(\boldsymbol{\rho}^{(n)}) \quad \text{eta} \quad \delta s^{(n)} := \delta s(\boldsymbol{\rho}^{(n)}). \quad (4)$$

Kostu funtzionalaren deribatua ($n + 1$). iterazioan kalkulatz, behar diren ordezkapen eta eragiketak egin, eta dena zerorekin berdinduz, n . iterazioan soluzioan egin behar dugun gehikuntza kalkulatzeko erabiliko dugun Gauss-Newton-en metodoaren aplikaziora iristen gara, $(\cdot, \cdot)$ operatzailea dagokion espazioko barneko biderkadura izanik:

$$\delta s^{(n)} := - \frac{(\mathbf{J}_s, \mathbf{H}(s^{(n)}) - \mathbf{M})_{l_{W_M}^2} + \lambda(\mathbf{I}, s^{(n)} - s_0)_{L_{W_{s_0}}^2}}{(\mathbf{J}_s^{(n)}, \mathbf{J}_s^{(n)})_{l_{W_M}^2} + \lambda(\mathbf{I}, \mathbf{I})_{L_{W_{s_0}}^2}}, \quad (5)$$

non

$$\mathbf{J}_s^{(n)} = \frac{\partial \mathbf{H}(s^{(n)})}{\partial s}. \quad (6)$$

Erregularizazio parametroaren balioa kalkulatzeko aukera ezberdinak daude. Gure kasuan kontsideratuko dugu, erregularizazio parametroaren balioa kostu funtzionalaren balioaren ehuneko bat dela. Zehazki, %10a hartuko dugu.

$$\lambda^{(n)} := 0.1 \times \frac{\left\| \mathbf{H}(s^{(n)}) + \mathbf{J}_s^{(n)} \delta s_{\lambda^{(n)}}^{(n)} - \mathbf{M} \right\|_{l_{W_M}^2}^2}{\left\| s^{(n)} + \delta s_{\lambda^{(n)}}^{(n)} - s_0 \right\|_{L_{W_{s_0}}^2}^2}. \quad (7)$$

Iterazio-prozesua gelditzeko irizpideak ere definitu beharra dago. Aukeratariko bat iterazio kopuru maximo bat ezartzea izan daiteke. Beste aukera bat n . eta $(n + 1)$. iterazioen kostu funtzionalen arteko diferentzia txikia denean prozesua gelditzea da. Gure kasuan, azken irizpide hau erabili dugu prozesua gelditzeko, diferentzia hau %1a baino txikiagoa denean prozesua geldiaraziz. Horretarako, hurrengo bi baldintzak definitu ditugu:

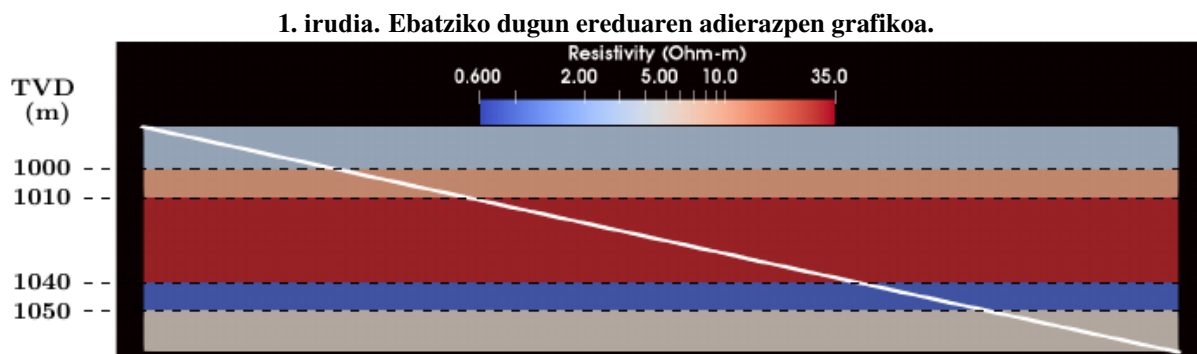
$$\frac{\left| \left\| \mathbf{H}(s^{(n+1)}) - \mathbf{M} \right\|_{l_{W_M}^2}^2 - \left\| \mathbf{H}(s^{(n)}) - \mathbf{M} \right\|_{l_{W_M}^2}^2 \right|}{\left\| \mathbf{M} \right\|_{l_{W_M}^2}^2} \leq \frac{0.5}{100} (= 0.5\%), \quad (8)$$

eta

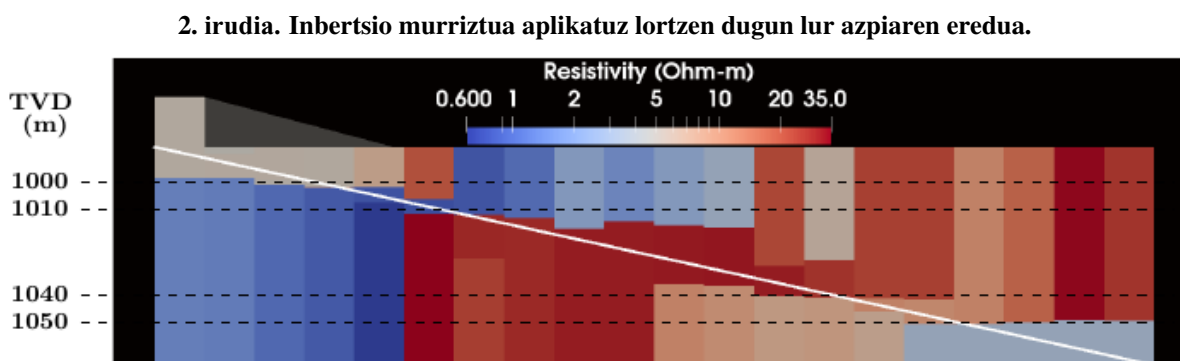
$$\lambda^{(n)} \times \frac{\left| \left\| s^{(n+1)} - s_0 \right\|_{L_{W_{s_0}}^2}^2 - \left\| s^{(n)} - s_0 \right\|_{L_{W_{s_0}}^2}^2 \right|}{\left\| s_0 \right\|_{L_{W_{s_0}}^2}^2} \leq \frac{5}{100} (= 5\%). \quad (9)$$

3.3. Zenbakizko adibidea

Proposatu dugun inbertsio metodoaren funtzionamendua aztertzeko zenbakizko adibide bat ebatziko dugu. Sintetikoki sortutako dugun problema bat kontsideratuko dugu. Ebatziko dugun eredua 1 irudian adierazi da. Irudi honetan ikus daitekeenez, erresistibitate ezberdineko bost geruzaz osatutako eredua da. Abzisa-ardatzean distantzia horizontala adierazi da (*Horizontal Distance*, HD), eta ordenatu-ardatzean benetako sakontasun bertikala (*True Vertical Deep*, TVD). Putzuaren ibilbidea lerro zuriaren bidez adierazi da.



Gure problemaren inbertsioa burutzeko aurkeztu dugun metodo murriztua erabiliko dugu, hau da, tresnaren posizio bakoitzerako hiru geruza eta zazpi aldagai kontsideratzen dituen metodoa. Inbertsio murriztuaren bidez lortu dugun eredua 2 irudian adierazi da. Bertan ikus daiteke, bigarren eta laugarren geruzetako erresistibitateen balioak txarto simulatuta daudela.

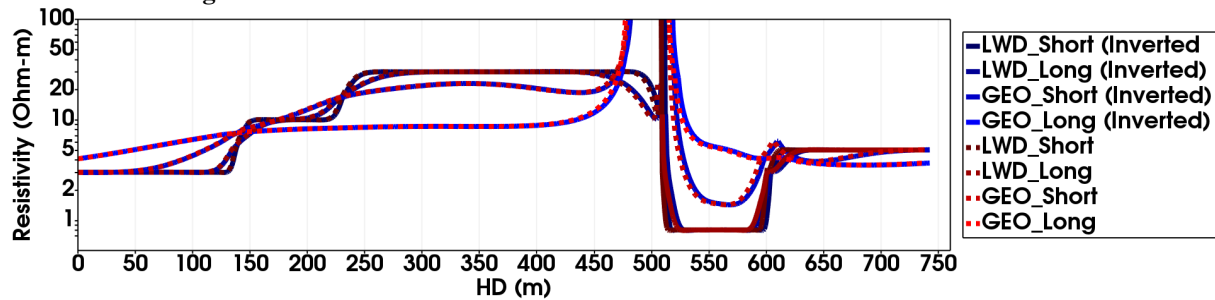


Inbertsio-prozesua ezaugarri desberdinak dituzten tresnak erabilia egin daiteke. Kontuan izan behar da tresna bakoitzak bere propietateak dituela, ordea. Adibidez, LWD tresnek zehaztasun handia daukate putzutik hurbil gaudenean, izan ere, tresnan instalatuta dauden igorleen eta hartzaileen arteko distantzia txikia da. Aldiz, putzutik urruntzen garen heinean, LWD tresnak ez dira egokiak. Putzutik urrun gaudenean GEO tresnak erabil daitezke materialen propietateak antzemateko. GEO tresnek igorle-hartzaile arteko distantzia handia daukate, eta ezaugarri honek putzutik urrun zehaztasun handia izatea ahalbidetzen du. Hainbat tresna erabiliz lortutako itxurazko erresistibitateak (egiazko balioak eta simulatutako balioak) ikus daitezke 3 irudian.

4. Ondorioak

Erabili ditugun tresna guztietarako itxurazko erresistibitatearen balioak eta egiazko erresistibitatearenak berdinak dira. Nahiz eta hori gertatu, inbertsioaren bidez lortutako lur azpiko eredua ez dator bat benetako ereduarekin. Hori gertatzearen arrazoia alderantzizko problema ondo planteatuta ez egotea da. Hau da, soluzio posible bat baino gehiago dago ebatzi nahi izan dugun problemarentzat. Izan ere, erresistibitateen banaketa bat baino gehiago dator bat gure tresnak erabiliz lortu ditugun neurketekin.

3. irudia. Egiatzko eta simulatutako itxurazko erresistibitateak hainbat zulaketa tresna erabiliz.



5. Etorkizunerako planteatzen den norabidea

Etorkizunari begira, 1.5D eta 2.5D metodoen konbinaketari ekingo diogu. Modu honetan inbertsio metodo sendo eta eraginkor bat garatzeko gai izango gara, konputazio-kostu baxu batekin erantzun egokiak emateko gai izango dena.

6. Erreferentziak

- Abubakar, A., T. M. Habashy, V. L. Druskin, L. Knizhnerman, eta D. Alumbaugh. 2008. 2.5D forward and inverse modeling for interpreting low-frequency electromagnetic measurements. *Geophysics* 73.F165–F177.
- Avdeev, D. B., A. V. Kuvshinov, O. V. Pankratov, eta G. A. Newman. 2002. Three-dimensional induction logging problems: Part 1 — An integral equation solution and model comparisons. *Geophysics* 67.413–426.
- Davydycheva, S., V. Druskin, eta T. Habashy. 2003. An efficient finite difference scheme for electromagnetic logging in 3D anisotropic inhomogeneous media. *Geophysics* 68.1525–1536.
- Gyulai, A., eta T. Ormos. 1999. A new procedure for the interpretation of VES data: 1.5-D simultaneous inversion method. *Journal of Applied Geophysics* 41.1–17.
- Pardo, D., eta C. Torres-Verdin. 2015. Fast 1D inversion of logging-while-drilling resistivity measurements for improved estimation of formation resistivity in high-angle and horizontal wells. *Geophysics* 80.E111–E124.
- Rodriguez-Rozas, A., D. Pardo, eta C. Torres-Verdin. 2017. Fast Simulation of 2.5D LWD Resistivity Tools. *79th EAGE Conference and Exhibition*.
- Wildes, D.G., R.Y. Chiao, C.M.W. Daft, K.W. Rigby, L.S. Smith, eta K.E. Thomenius. 1997. Elevation performance of 1.25D and 1.5D transducer arrays. *IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics, and Frequency Control* 44.1027–1037.

Ingeniaritzan geometria lantzerako bideratutako planteamendu baten azterketa eta gauzatzea

Alvarez Gonzalez, Irantzu¹, Alberdi Celaya, Elisabete², Eguia Ribero, Maria Isabel²,
Etxeberria Ramirez, Paulo¹, Garcia Lopez, Maria Jose¹, Muñoz-Matute, Judit³

¹ Adierazpen Grafikoa eta Ingeniaritzako Proiektuak Saila, Euskal Herriko Unibertsitatea (UPV/EHU)

² Matematika Aplikatua Saila, Euskal Herriko Unibertsitatea (UPV/EHU)

³ Matematika Aplikatua, Estatistika eta Ikerkuntza Operatiboa Saila, Euskal Herriko Unibertsitatea (UPV/EHU)

irantzu.alvarez@ehu.eus

Laburpena

Ikasle askorentzat geometria arlo teoriko eta abstraktua da eta kosta egiten zaie ulertzea. Ikasleek geometria ikasten dutenean aurkitzen dituzten zailtasunak batez ere hizkuntza matematikoaren ulermenetik eta bistaratze espazialerako gaitasunetik eratorriak dira. Proiektu honetan geometria lantzeko balio duten jarduerak elkarrenergile edo interaktiboak diseinatu eta inplementatu dira, ikasleei geometria ikasten laguntzeko baliabide berriak eskainiz. Ikerketa eta esperimentazio lan hau ingeniaritzako ikasleekin eraman da aurrera, eta bere oinarriak izan dira software librearen erabilera, ikasketa dinamikoa, ikasketa aktibo eta autonomia, diziplinartekotasuna bultzatzea.

Hitz gakoak: aljebra eta geometria, GeoGebra, adierazpen grafikoa, ingeniaritza

Abstract

For the vast majority of students, geometry is a theoretical and abstract subject, difficult to understand. The problems encountered by students in the study of geometry derive mainly from the understanding of mathematical language and spatial visualization. In this project, interactive activities are designed and implemented to work on geometry, providing students with new resources to help them in the study of the subject. This research and experimentation has been carried out with engineering students, and its fundamentals are to promote the use of free software, dynamic learning, active and autonomous learning and interdisciplinarity.

Keywords: algebra and geometry, GeoGebra, graphical expression, engineering

1. Sarrera eta motibazioa

Gaur egun irakaskuntza-ikaskuntza prozesuetako asko aurrez aurreko ingurune batean ez ezik ohiko klasetik kanpo ere gertatzen dira. Hezkuntza aktibitateak dibertsifikatzeko dauden aukerak ugariak izan arren, irakaskuntza prozesu askok ohiko bideak jarraitzen dituzte, eta jarraitzen diren bide horiek nekez egokitzen dira informazioaren gizartera. Egungo agertokia esperientzia konbinatuak erabiltzeko egokiagoa da, formakuntza modalitate bateko edo besteko izaera eskusiboa duten aukerak erabiltzeko baino. Ondorioz, arrazoizkoa da irakaskuntza-ikaskuntza prozesua bateratua izatea, aurrez aurreko presentzia eskatzen duten jarduerak eta ez dutenak konbinatuz. Normalean, aurrez aurreko presentziarik eskatzen ez duten jarduerak interneteko atarietan sostengatuz garatzen dira. Informazio eta Komunikazio Teknologien (IKT) kulturaren ondorioetako bat gela birtualen sorrera eta erabilera izan da. Orain arrunta da ikasleek gela fisiko bat eta gela birtual bat izatea, arrunta den bezalaxe IKTetan oinarritutako material dinamiko eta elkarrenergile edo interaktiboa izatea.

Ikerlan hau unibertsitate mailako geometriaren lanketan zentratzen da. Zehazki Bilboko Ingeniaritza Eskolan (Euskal Herriko Unibertsitatea UPV/EHU) Ingeniaritza Zibileko graduako lehenengo mailan irakasten den “Aljebra eta Geometria” irakasgaian garatu da, eta GeoGebra software-a irakasgaian lantzen diren geometriako kontzeptuak hobeto ulertzen laguntzeko erabilgarria den aztertu da.

2. Arloko egoera eta ikerketaren helburuak

Hezkuntza-sistemak azken bi hamarkadetan izan duen erronka IKTak irakaskuntza-ikaskuntza prozesuan barnertzea izan da. Irakasleek aztertu behar izan dute beraiek irakasten dituzten irakasgaietan IKTak erabil daitezkeen ala ez, erabiltzekotan zein ekarpen egiteko erabiliko diren eta testuinguru horretan beraiek irakasle gisa izango duten eginkizuna (Hennessy *et al.*, 2005; Salinas, 1997, 1999, 2002). Honen ondorioa da, askotariko IKT baliabideak (software, gela birtual, arbel elektronikoa, eta abar) gaur egungo sistemako parte izatea. Baliabide horiei probetxua ateratzeko zer eta nola erabili izaten da egin beharreko hausnarketetako bat eta hausnarketa hori irakasgaiaren araberakoa izaten da.

Geometria arlo teoriko eta abstraktua da, eta sarritan kosta egiten da ulertzea. Geometria ikastea aurkitzen diren zailtasunetako asko hizkuntza matematikoaren ulermenetik eta bistaratze espazialerako gaitasunetik eratorzen dira. Badira IKTak erabiliz matematikak lantzerako bideratutako hainbat esperientzia (Lasa eta Wilhelmi, 2013, 2014). Esperientzia horietako batzuek GeoGebra software librean oinarrituz garatu izan dira (Calder, 2011; Lasa eta Wilhelmi, 2013, 2014; Samuels eta Haapasalo, 2012; Kutluca, 2013). Geometriarako ez ezik makinaren teoria (Iriarte *et al.*, 2014), mekanismo artikulatuak (Manzano Mozo *et al.*, 2017) eta beste gai batzuekin lotutako simulazioak egiteko ere erabili izan da GeoGebra (Vega-Alvarado *et al.*, 2018). GeoGebra kode irekiko software dinamikoa da, eta doakoa da helburu komertzialik ez duen erabilerarako. Aljebra eta geometriarekin lotutako kontzeptuak bere barnean biltzen ditu, eta egokia da besteak beste, tresna geometriko dinamikoak sortzeko, adierazpen grafikoak egiteko edota objektu matematikoen tratamendu aljebraikorako.

Esperientzia ezberdinetan aipatzen dira GeoGebra software-aren indarguneak, bai geometriaren ikasketan eta baita izaera dinamikodun beste hainbat alorretan ere. Gainera, esperientzia horiek hezkuntza-maila ezberdinetan garatuak izan dira, lehen-hezkuntzatik unibertsitate mailaraino. Hori guztia ikusirik, aztertu nahi izan dugu “Aljebra eta Geometria” irakasgaiaren zenbait kontzeptu lantzeko GeoGebra ea lagungarria gerta dakigukeen. Bestalde, irakasgai horretan ikasten den geometriako parte lantzeko software-ak eskaintzen dituen tresnak ezagutu nahi izan ditugu. Paperean eskuz ebazten ditugun ariketak software bidez ebatzi eta emaitzak bistartzeko duen ahalmena ere aztertu nahi izan dugu. Era berean neurtu nahi izan dugu GeoGebra software-ak ikasleei geometriako kontzeptuen ulermenean ea laguntzen ote dien. Hori neurtzeko asmoz ikasleei kontzeptu ezberdinei buruzko ulermen maila baloratzeko eskatu zaie bi momentutan: gaia GeoGebra erabili gabe landu denean eta GeoGebra erabilia landu denean.

Azkenik, softwareak eskaintzen duen ingurunea baloratu nahi izan da, burutu nahi diren ekintzak agindu bidez idazteak duen zailtasuna eta honelakoak. Helburua software-a erabiliz geometriako kontzeptuak hobeto ulertzea izan baita, horretarako egin beharreko bitarteko ekintzetan ahalik eta zailtasun gutxien aurkituta. Hau da, software-aren erabilerraztasuna ere neurtu nahi izan da.

3. Ikerketaren muina

Ikerketa hau Ingeniaritza Zibileko graduako lehenengo mailan irakasten den “Aljebra eta Geometria” irakasgaiaren burutu da, eta 53 ikasleek parte hartu dute bertan. Irakasgai hau lehenengo lauhilekoan irakasten da eta 6 kreditutako (*European Credit Transfer and Accumulation System*, ECTS) balioa du. Hurrengo lerroetan azalduko ditugu jarraitutako metodologia eta lortu diren emaitzak.

3.1. Metodologia

GeoGebra software-aren inguruan egin den hasierako ikerketa software-aren egokitasuna eta erabilerraztasuna neurtzera bideratuta egon da. Lehen ikerketa hau irakasgaiaren irakasleek eraman dute aurrera eta honen ondorioa izan da GeoGebra gure helbururako egokia dela.

Ondoren, ikasleek ordenagailu geletan GeoGebra erabilia garatu dituzten lau praktika diseinatu dira. Orain arte klase arruntetan bakarrik landu izan dena, ordenagailu bidez egitea eta bistaratzea izan da helburua. Gainera, ordenagailuz ariketak egitea eskuz egitea baino azkarragoa denez, ariketa bera ebazteko prozedura ezberdinak probatu ahal izan dituzte.

Praktika horietan landu diren gaiak honako hauek izan dira:

- Espazio afineko elementuen definizioa eta adierazpena.
- Elementu ezberdinen arteko posizio erlatiboa espazioan (zuzenen artekoa, planoen artekoa, zuzen-plano artekoa).

- Perpendikularitasuna (zuzen elkarzutak, plano elkarzutak, zuzen eta plano elkarzutak).
- Distantziak (bi punturen artekoa, puntu baten eta plano baten artekoa, puntu baten eta zuzen baten artekoa, bi plano paraleloren artekoa, zuzen eta plano paraleloren artekoa, bi zuzen paraleloren artekoa, elkar gurutzatzen duten bi zuzenen artekoa).
- Simetriak (puntu batekiko puntu simetrikoa, zuzen batekiko puntu simetrikoa, plano batekiko puntu simetrikoa).
- Angeluak (bi zuzenen artekoa, zuzen-plano artekoa, bi planoren artekoa).

Praktika horietako bakoitzean jarraitu den prozedura honako hau izan da:

1. Azalpenak: Praktika bakoitzaren hasieran, irakasleak irakasgaiaren testuinguruan kokatu du praktikan landuko dena. Praktikako ariketak aurkeztu ditu eta horiek GeoGebra bidez ebazteko beharrezko aginduen azalpena eman du.
2. Atariko testa: Ikasleek praktika egin aurretik test bat bete dute. Egun horretako praktikan landuko dutenari buruz GeoGebra erabili aurretik beraiek daukaten ezagutzari buruzko pertzepzioaz galdetu zaie atariko test horretan. Galdera bakoitzari 1-5 eskala erabilita erantzun die, 1 balioa adostasunik eza izanik, eta 5 balioa guztiz ados egotea.
3. Praktika: Ikasleek egun horretako praktika era autonomoan burutu dute GeoGebra erabiliz.
4. Osteko testa: Praktika burutu ostean berriro bete dute atarikoaren antzeko test bat, jakin nahi izan baita ea beraien ezagutzari buruz daukaten pertzepzioa GeoGebra erabili ostean hobetu ote den. Galdera bakoitzari 1-5 eskala erabilita erantzun die berriro.

Praktika bakoitzeko atariko eta osteko testetan, GeoGebraren erabilerari buruzko galdera orokorrak eta praktika bakoitzean landu diren kontzeptuei buruzko galdera zehatzak erantzun dituzte ikasleek. Lehenengo praktikako hasierako eta osteko testetako zenbait galdera orokor 1 eta 2 tauletan ikus daitezke. Eta bigarren praktikako hasierako eta osteko testetako zenbait galdera zehatz 3 eta 4 tauletan jaso dira.

1. taula. Lehenengo praktikaren atariko testeko galdera orokorrak.

G1- Programa informatikoen erabilerak kontzeptu geometrikoak bistaratzen eta hobeto ulertzen lagun diezadake.
G2- Programa informatikoen erabilerak geometriaren alorreko problemak aztertzen eta soluzioa aurkitzen lagun diezadake.
G3- Programa informatikoen erabilerak nire ikasketa autonomoan laguntzen dit.
G4- Programa informatikoen erabilerak irakasgaiaren dudaren interesa handitzen du.

2. taula. Lehenengo praktikaren osteko testeko galdera orokorrak.

G1- Programa informatikoen erabilerak kontzeptu geometrikoak bistaratzen eta hobeto ulertzen lagundu dit.
G2- Programa informatikoen erabilerak geometriaren alorreko problemak aztertzen eta soluzioa aurkitzen lagundu dit.
G3- Programa informatikoen erabilerak nire ikasketa autonomoan lagundu dit.
G4- Programa informatikoen erabilerak irakasgaiaren dudaren interesa handitu du.

Jarraitutako prozedurarekin jakin nahi izan da “Algebra eta Geometria” irakasgaiarako GeoGebra ea egokia eta erabilerraza den, eta ea ikasleei lagungarria gertatu zaien. Zentzu honetan, software-ak hiru dimentsiotan lan egiteko eskaintzen dituen aukerak aztertu dira. 1 irudian praktiketako baten ikasleek egin beharreko ariketa bati dagokion GeoGebra bidezko ebazpena ikus daiteke. Ariketa honetan, A eta B puntuak eta α eta β planoak ematen dira datu gisa. A eta B puntuek bi zuzenen arteko distantziarik txikieneko zuzenkia osatzen dute. Ikasleari eskatzen zaio bi zuzen horiek kalkulatzeko, jakinik zuzenetako batek A puntua barnean duela eta α planoarekiko paraleloa dela, eta bestea B puntua barnean izanik β planoarekiko paraleloa dela.

3.2. Emaitzak

Metodologiari dagokion atalean azaldu den moduan, bi ziren galdetegiak galderen helburuak. Alde batetik, software-aren erabilerak arlo hauetan izan ditzakeen onura orokorrak aztertzea (ikus 1 taula): kontzeptuen ulermeneari, arazoei soluzioak bilatzerakoan, ikasketa autonomoan, motibazioan, eta abar. Eta bestetik, geometriako

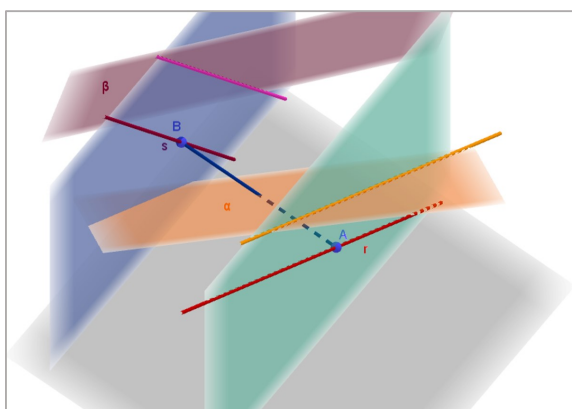
3. taula. Bigarren praktikako atariko testeko zenbait galdera zehatz.

A1- Zuzenek espazioan izan ditzaketen posizio erlatiboak ezagutzen ditut.
A2- Planoek espazioan izan ditzaketen posizio erlatiboak ezagutzen ditut.
A3- Zuzen batek eta plano batek espazioan izan ditzaketen posizio erlatiboak ezagutzen ditut.
A4- Plano-sortaren adierazpen aljebraikoa ezagutzen dut.
A5- Plano-sorta bat bistaratzeko gai naiz.
A6- Badakit zein baldintza aljebraiko bete behar diren bi zuzen espazioan gurutza daitezen.
A7- Badakit zein baldintza aljebraiko bete behar diren zuzen bat plano baten barruan egon dadin.
A8- Hezkuntzako beste etapa batzuetan jasotako ezagutzak erabiliz problema geometrikoak ebazteko gai naiz.
A9- Espazioko geometriako problemak ebazteko prozedurarik egokiena aukeratzeko gai naiz.

4. taula. Bigarren praktikaren osteko testeko zenbait galdera zehatz.

O1- Zuzenek espazioan izan ditzaketen posizio erlatiboak bistaratzen ditut.
O2- Planoek espazioan izan ditzaketen posizio erlatiboak bistaratzen ditut.
O3- Zuzen batek eta plano batek espazioan izan ditzaketen posizio erlatiboak bistaratzen ditut.
O4- Plano-sorta bat bistaratzeko gai naiz.
O5- Klase ordu honetan jaso ditudan edukiei esker problema geometrikoen soluzioa aurkitzeko gai naiz.
O6- Espazioko geometriako problemak ebazteko prozedurarik egokienak aukeratzeko gai naiz.
O7- Proposatutako ariketa guztiak egin ditut.
O8- Praktika egiteko jaso dudana materiala egokia izan da.
O9- Jarraitutako metodologiak ikasketan lagundu dit.
O10- Burutu dugun praktika interesgarria iruditut zait.

1. irudia. GeoGebra erabiliz ebatzitako ariketa baten adibidea.



- $A = (5, 1, 4)$
- $B = (5, 5, 4)$
- $AB = 4$
- $\alpha: x + y + z = 12$
- $\beta: 4x + 5y + 2z = 60$
- $\gamma: y = 1$
- $r1: X = (6, 1, 5) + \lambda (-1, 0, 1)$
- $r: X = (5, 1, 4) + \lambda (-0.71, 0, 0.71)$
- $PB: y = 5$
- $s1: X = (6.4, 5, 4.7) + \lambda (-2, 0, 4)$
- $s: X = (5, 5, 4) + \lambda (-0.45, 0, 0.89)$
- $d = 4$

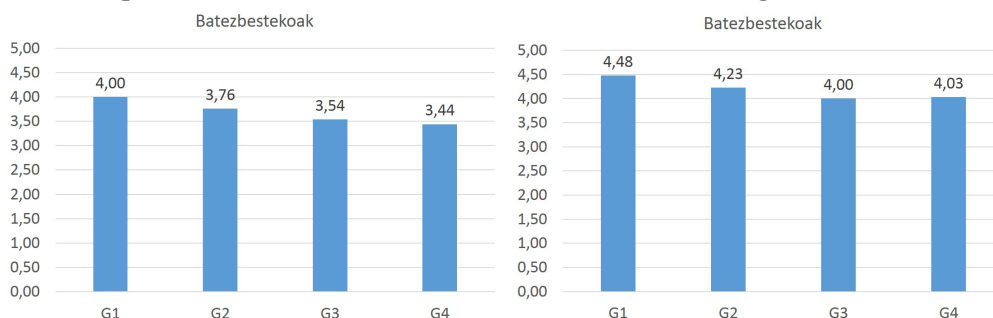
kontzeptu eta prozedura zehatzak hobeto ulertzeko, software-a baliagarria zen ala ez ebaluatzea. Galdetegietako erantzunak aztertu eta gero (ikus 2 irudia), GeoGebra erabiltzearen onura orokorrak argiak dira. Atal guztietan, ikasleen adostasuna puntu erdi igo da atariko galdetegitik GeoGebra aplikatu osteko galdetegira. Kontzeptuak bistaratzeari eta ulertzeari zein geometriaren alorreko problemak aztertzeari eta soluzioa aurkitzeari dagokienez, nabaria da programaren ekarpena, betiere ikasleen iritziz. Ikasketa autonomoa eta irakasgaiaren interesa handitzeari dagokionez ere (G3 eta G4 galderak) baliagarritzat jotzen dute ikasleek GeoGebra, beste maila batean (4 inguruko puntuazioaz) bada ere. “Aljebra eta Geometria” irakasgaia berriz ikasi beharko balute ea programa erabiliko luketen ere galdetu zaie, eta ikasle gehienek erabiliko lukete.

Galdera orokorrez gain, beste galdera zehatzago batzuk egin ziren, praktika bakoitzean landu beharreko kontzeptu eta prozeduren ulermenean GeoGebrak zeukan eragina neurtzeko asmoarekin. Galdera horietan honelako ezagutzak eta gaitasunak, besteak beste, aztertu ziren:

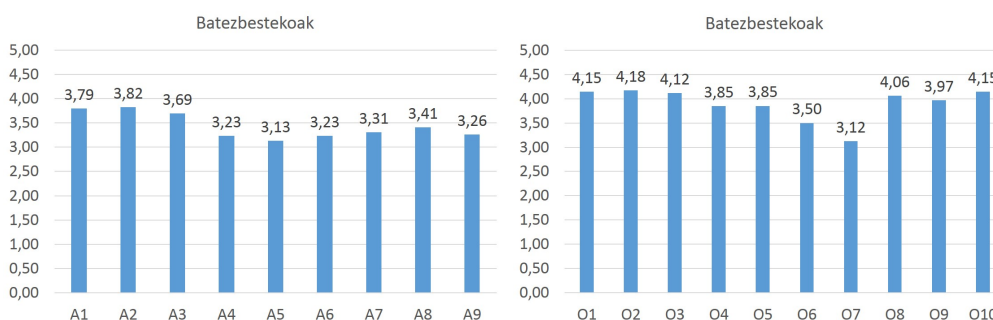
- Geometriako elementu-motak ezagutzea.
- Elementuen arteko posizio erlatiboak ezagutzea.
- Problema matematikoki ebazteko prozedurak ezagutzea eta aplikatzea.
- Espazioko geometriako problema ebazteko prozedura egokiak aukeratzea eta aplikatzea.

Emaitzak aztertuta (3 irudia), GeoGebraren ekarpena nabaria da aipatu diren lehen hiru kasuetan (elementu-motak, haien arteko posizio erlatiboak eta prozedura sinpleak). Espazioko prozeduretan ekarpena positiboa izan arren, txikiagoa da. Azken prozedura horiek garapen luzeagoa eta izaera guztiz tridimentsionala dutenez, geometria dinamikoak eskaintzen duen laguntza ez da hain eraginkorra.

2. irudia. Lehen praktikako atariko (ezker) eta osteko (eskuin) testetako galdera orokorren emaitzak.

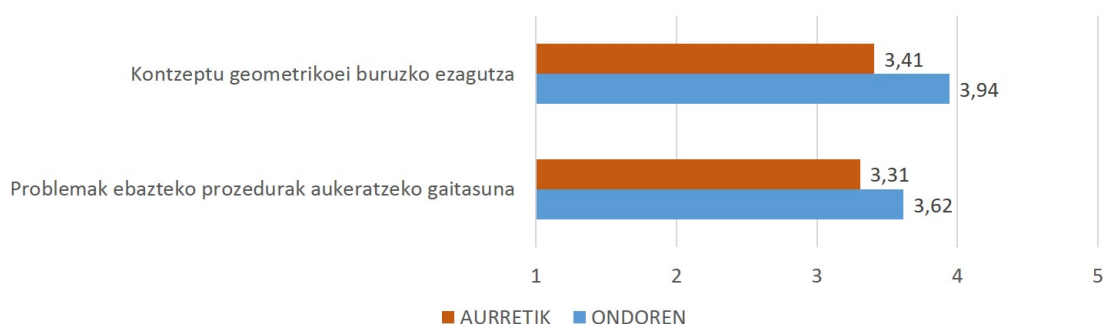


3. irudia. Bigarren praktikako atariko (ezker) eta osteko (eskuin) testetako zenbait galdera zehatzen emaitzak.



GeoGebra erabili gabe edo erabilia ikasleek geometriako kontzeptuei eta prozedurei buruz daukaten ulermen mailari buruzko informazioa 4 irudian ikus daiteke. Ikasle guztiek software-a erabili dutenez, hura erabili aurretik eta erabili osteko ezagutza maila da era honetan neurtu dena.

4. irudia. GeoGebra erabili gabe eta erabilia ikasleen ezagutza maila.



4. Ondorioak

GeoGebra programa geometriaren irakaskuntzan aplikatu eta gero, irakasleek oso lanabes egokitzen jotzen dute. Software-ak hiru dimentsiotan lan egiteko eskaintzen dituen aukerak oso egokiak dira, bai irakasgaian ikasten diren geometriako kontzeptuak lantzeko, baita paperean eskuz ebazten diren problemak garatzeko ere.

Ikasleei erabilerraza iruditu zaie programa. Sintaxi errazeko software-a denez, saio praktikoko gutxirekin nahikoa baita erabiltzaileek segurtasuna har dezaten. Ikasleen erantzunak aztertu ondoren, GeoGebra erreminta lagungarria dela ondorioztatzen da. Hiru dimentsiotako adierazpen grafiko sendoa eta sorkuntza dinamikoa oinarrituta, programaren ekarpena handia da geometriako elementuak eta haien arteko posizio erlatiboak hobeto ulertzeko, eta horien inguruko problema sinpleak ebazteko.

Aurtengo esperientzia ordenagailu geletan aurrez aurre burutu bada ere, aurrera begira, gela birtualean jar daitezke software-a erabiltzeko oinarritzko aginduak eta ikasleek beraien kabuz egin ditzakete ariketak.

5. Etorkizunerako planteatutako norabidea

Irakasgai baten garapenean software bat barneratzeak zenbait azterketa egitera behartzen gaitu. Gure kasuan, “Aljebra eta Geometria” irakasgaian landu nahi ditugun edukiak lantzeko GeoGebra ea egokia ote den eta erabiltzeko zailtasunik ote duen aztertu ditugu lehendabizi. Aipatutako irakasgaian GeoGebra lagungarri izan daitekeela ondorioztatu ostean, bigarren azterketa baten beharrezana izan dugu, zehazki zer egingo den eta egingo den hori diseinatzeko, alegia.

Etorkizunera begirako lana izan daiteke irakasgaiko kontzeptu teorikoak hobeto ulertzera bideratutako applet dinamikoa eta interaktiboak sortzea. Applet dinamikoa horiek ikasgela birtualean izan ditzakete ikasleek eskura eta beraien kontura landu ditzakete klaseko esparrutik kanpo. Beste aukera bat izan daiteke, unibertsitate mailako “Adierazpen Grafikoa” bezalako irakasgaietan GeoGebra erabilgarritasuna aztertzea edota irakasgai bietako (“Aljebra eta Geometria” eta “Adierazpen Grafikoa”) loturak aurkitzera bideratutako aktibitateak GeoGebra diseinatzea.

6. Erreferentziak

Calder, N. 2011. *Processing Mathematics Through Digital Technologies*. Sense Publisher.

Hennessy, S., K. Ruthven, eta S. Brindley. 2005. Teacher perspectives on integrating ICT into subject teaching: commitment, constraints, caution, and change. *Journal of Curriculum Studies* 37(2).155–192.

Iriarte, X., J. Aginaga, eta J. Ros. 2014. Teaching mechanism and machine theory with GeoGebra. In *New Trends in Educational Activity in the Field of Mechanism and Machine Theory*, 211–219. Springer International Publishing.

Kutluca, T. 2013. The effect of geometry instruction with dynamic geometry software; GeoGebra on Van Hiele geometry understanding levels of students. *Educational Research and Reviews* 8(17).1509–1518.

Lasa, A., eta M. R. Wilhelmi. 2013. Use of geogebra in explorative, illustrative and demonstrative moments. *Revista do Instituto GeoGebra de São Paulo* 2(1).52–64.

—, eta —. 2014. Geogebra eta bigarren hezkuntzako irakasleen prestakuntza. *Hik Hasi* 188.32–34.

Manzano Mozo, J., M. Gómez García, eta J. Mozo Fernández. 2017. Mecanismos articulados: Geometría dinámica y cinemática en un entorno educativo STEM. *Innoeduca. International Journal of Technology and Educational Innovation* 3(1).15–27.

Salinas, J. 1997. Nuevos ambientes de aprendizaje para una sociedad de la información. *Pensamiento Educativo* 20.81–104.

— 1999. El rol del profesorado universitario ante los cambios de la era digital. In *Actas del I Encuentro Iberoamericano de Perfeccionamiento Integral del Profesor Universitario*, Caracas: Universidad Central de Venezuela.

— 2002. Modelos flexibles como respuestas de las universidades a la sociedad de la información. *Acción Pedagógica* 11 (1). (Online erako artikulua).

Samuels, P., eta L. Haapasalo. 2012. Real and virtual robotics in mathematics education at the schooluniversity transition. *International Journal of Mathematical Education in Science and Technology* 43(3).285–301.

Vega-Alvarado, E., E. A. Portilla-Flores, G. A. Ardul Munoz-Hernandez, E. Mezura-Montes, G. Sepúlveda-Cervantes, eta P. Bautista-Camino. 2018. A memetic algorithm based on Artificial Bee Colony for optimal synthesis of mechanisms. *Revista Internacional de Métodos Numéricos para Cálculo y Diseño en Ingeniería* 34(1).1–10.

7. Eskerrak

Autore guztiek eskerrak eman nahi dizkiote UPV/EHU-ko Berrikuntzaren, Gizarte Konpromisoaren eta Kulturgintzaren arloko errektoreordetzari, SAE/HELAZen bidez lan hau finantzatu baitu.

Elisabete Alberdi Celaya eta Judit Muñoz Matute autoreak Euskal Gobernuako Ikerketa Talde Kontsolidatuak (IT649-13 Mathematical Modeling, Simulation, and Industrial Applications M2SI), Espainiar Gobernuako Ekonomia eta Lehiakortasun Ministeritzako MTM2016-76329-R (AEI/FEDER, EU), eta MTM2016-81697-ERC/AEI erreferentzia zenbakidun proiektuek partzialki diruz lagunduak izan dira.

Judit Muñoz Matutek Euskal Herriko Unibertsitateko dirulaguntza ere jaso du, No. PIF15/346.

Espazio-denborako EFMaren eta lerroen metodo esplizituen arteko baliokidetasuna: egonkortasun-baldintza

Muñoz-Matute, Judit¹; Alberdi Celaya, Elisabete¹; Pardo, David^{1,2,3}

eta Calo, Victor Manuel^{4,5}

¹Euskal Herriko Unibertsitatea (UPV/EHU)

²BCAM - Basque Center for Applied Mathematics, Bilbao

³IKERBASQUE, Basque Foundation for Science, Bilbao

⁴Applied Geology, Western Australian School of Mines, Faculty of Science and Engineering, Curtin University, Perth, WA, Australia 6845

⁵Mineral Resources, Commonwealth Scientific and Industrial Research Organisation (CSIRO), Kensington, WA, Australia 6152

elisabete.alberdi@ehu.eus

Laburpena

Denboraren eremuko problemek helburuetara orientatutako egokitzapena aplikatzeko, espazio-denborari dagokion formulazio bariazionala izatea ezinbestekoa da. Problema askatzeko espazio-denborako Elementu Finituen Metodoa (EFM) erabil badaiteke ere, lerroen metodoa erabiliz ere egin daiteke egokitzapena. Honek espazio-denborako EFMaren eta Ekuazio Diferentzial Arruntak (EDAk) askatzeko erabiltzen diren metodoen arteko baliokidetasuna aurkitzea eskatzen du. Erlazio hau ezaguna da metodo inplizituentzat, eta oraintsu metodo esplizituentzat ere aurkitu dugu. Metodo esplizituek inplizituek baino konputazio-kostu txikiagoa badute ere, egonkortasunari dagokion baldintza bete behar dute emaitza onak lortu nahi badira. Lan honetan egonkortasun baldintzaren kudeaketaz jardungo dugu.

Hitz gakoak: difusio ekuazio lineala, helburuetara orientatutako egokitzapena, metodo esplizituak denboran, erro-rearen adierazpena, elementu finituen metodoa

Abstract

For time-domain goal-oriented adaptivity a full space-time variational formulation is needed. Even though the problem can be solved employing space-time Finite Element Method (FEM), adaptivity can be performed using the Method of Lines (MoL). This requires to find the equivalence between the space-time FEM and the numerical methods for Ordinary Differential Equations (ODEs). This relationship is known for implicit methods, and recently, we have found it for some explicit methods. Explicit methods are computationally cheaper than the implicit ones, but they have to satisfy the stability requirement in order to obtain good results. This work is focused on how to perform adaptivity while satisfying the stability requirement.

Keywords: linear diffusion equation, goal-oriented adaptivity, explicit methods in time, error representation, finite element method

1. Sarrera eta motibazioa

Egokitzapen prozesuak tresna garrantzitsuak dira Deribatu Partzialetako Ekuazioak ebazterakoan (DPE), konputazio-kostua minimizatzeko gain soluzio zehatzak lortzea ahalbidetzen duten sare optimoak sortarazten baitituzte. Denboraren eremuko problemetan espazio-denborako Elementu Finituetako Metodoan (EFM) oinarritutako zenbait egokitzapen-algoritmo existitzen dira. Honen adibide dira *tent-pitching* deitutako estrategiak, zeintzuetan EFM metodoa erabiltzen den egiturarik gabeko sareak lortzeko (Erickson *et al.*, 2005; Abedi *et al.*, 2006; Miller eta Haber, 2008; Gopalakrishnan *et al.*, 2015). Beste alde batetik, badira zenbait algoritmo, gehienetan denboraren ibilbidean oinarritutakoak, espazioan zein denboran *hp*-metodo egokituak darabiltzatenak (Schötzau eta Sch-

wab, 2000b,a; Werder *et al.*, 2001) edota helburuetara orientatuko egokitzapen-algoritmoak (Besier eta Rannacher, 2012; Bangerth eta Rannacher, 2001). Metodo hauetan test eta saiakera funtzioek espazio-denboran tentsore biderketaren egitura dutela suposatzen da, eta denboran ez-jarraituak diren zenbait funtzio oinarrian kontsideratuz, espazio-denborako EFMak denboraren ibilbideko eskemari jarraitzen dio. Hala ere, momentuz, bakarrik denboran inplizituak diren metodoak daude erabilgarri literaturan, beraien egitura bariazioanala ezagutzen baita (Bangerth *et al.*, 2010; Köcher eta Bause, 2014). Gure helburua, denboraren eremuko DPeei helburuetara orientatutako egokitzapena aplikatzea izan da, denboran esplizituak diren metodoak erabiliz. Metodo esplizituek inplizituek baino konputazio-kostu txikiagoa dutenez, algoritmo eraginkorragoa diseina daiteke.

2. Ikerketaren helburuak

Helburuetara orientatutako egokitzapen-algoritmoak oso erabilgarriak dira soluzioaren zenbait ezaugarri fisiko zehaztasunez hurbildu nahi direnean (Pardo *et al.*, 2006b; Mathelin eta Le Maître, 2007; Chamoine eta Ladevèze, 2008; Almeida eta Oden, 2010; Van der Zee *et al.*, 2011; Alvarez-Aramberri eta Pardo, 2017; Darrigrand *et al.*, 2015, 2018). Hauxe gertatzen da ingeniaritzako zenbait problematan. Ezaugarri nabarmen hauei interes-kantitate deritze eta ohikoa da amaierako funtzionalak erabiliz adieraztea. Egokitzapen-algoritmoen helburua interes-kantitateko errorea murriztea izaten da (Becker eta Rannacher, 1996; Oden eta Prudhomme, 2001; Prudhomme eta Oden, 2003; Pardo *et al.*, 2006a, 2007). Honetarako problema duala definitzen da, non amaierako funtzionala iturri bihurtzen den. Problema dualak espazio-denborako puntu bakoitzak interes-kantitatean duen eraginari buruzko informazioa ematen du. Interes-kantitateko errorea problema primalaren eta dualaren erroreen menpe idazten da, eremu osoko integral baten bidez. Bukatzeko, errore honen goi-borne bat kalkulatzeko da elementu lokalen ekarpenen batuketa gisa, eta ekarpen hauen batura da egokitzapen prozesua gidatzen duena.

Denboraren menpeko problemetan, autore gehienek problema primala eta duala diskretizatzen dituzte lerroen metodoa erabiliz (ingelesez *Method of Lines*, MoL) (Schiesser, 2012; Collier *et al.*, 2013; Alberdi eta Anza, 2014; Vignal *et al.*, 2017). Aipatutako metodoan espazioko formulazio bariazional batetik hasita, espazioko aldagaia EFMa erabilita diskretizatzen da. Era honetan lortzen den Ekuazio Diferentzial Arrunteko (EDA) sistema EDAk askatzeko zenbakizko metodoen bidez ebazten da. Hala ere, denboraren eremuan helburuetara orientatutako egokitzapena egiteko aldagai biak ageri direneko problemaren formulazio bariazionala ezinbestekoa da, interes-kantitateko errorea eremu osoko integral baten bidez adierazteko (Díez eta Calderón, 2007). Honek esan nahi du, lerroen metodoaren bidezko diskretizazioa egin nahi bada beharrezkoa dela espazio-denborako EFMarekin duen baliokidetasuna ezagutzea.

Ezaguna da, zehaztasun ordena baxuko denboraren eremuko zenbait EFM eta EDAk ebazteko zenbakizko metodo batzuk baliokideak direla (Schieweck, 2010; Hussain *et al.*, 2011; Ahmed eta John, 2015). Hauxe gertatzen da esaterako Eulerren metodo inplizituarekin edota Crank-Nicholson-en metodoarekin. Aipatu ditugun metodo biak inplizituak dira denboraren eremuan, eta izaera inplizitudun metodoak dira helburuetara orientatutako egokitzapenean erabili izan direnak. Oraintsu Runge-Kutta esplizituak ez-jarraituak diren Petrov-Galerkin metodo gisa interpreta daitezkeela frogatu da (Muñoz-Matute *et al.*, 2018). Aipatutako lanean, Runge-Kutta metodo bat emarik, berari dagozkion test eta saiakera funtzioak nola eraiki daitezkeen azaltzen da, denboraren eremuan integrazio zehatza erabiliz.

Denboraren eremuan esplizituak diren metodoak erabiltzeak egonkortasunari dagokion Courant-Friedrichs-Lewy baldintza (CFL) betetzera behartzen gaitu (Strang, 1968). Honek esan nahi du egokitzapen estrategiak CFL baldintza bete behar duela bai hasieran, eta baita prozesuan zehar ere. Hau da, espazioan egindako fintzeen ondoren denboran burutu beharko dira fintzeak CFL baldintza berreskuratu nahi bada. Egonkortasun baldintza bete dadin denboraren sarean egin beharreko egokitzapena aztertuko dugu hemen.

3. Ikerketaren muina eta ondorioak

Izan bedi $\Omega \subset \mathbb{R}$ eta $I = (0, T] \subset \mathbb{R}$. Difusio ekuazio lineala kontsideratuko dugu:

$$\begin{cases} u_t - u_{xx} = f, & \text{in } \Omega \times I \\ u = 0, & \text{in } \partial\Omega \times I, \\ u(0) = u_0, & \text{in } \Omega \end{cases} \quad (1)$$

$f \in L^2(I; H^{-1}(\Omega))$ eta $u_0 \in H_0^1(\Omega)$ izanik. (1) problemaren soluzio ahulak honako baldintza hauek betetzen

ditu:

$$\begin{aligned}\langle u_t, v \rangle + (u_x, v_x) &= \langle f, v \rangle, \quad \forall v \in H_0^1(\Omega), \\ (u(0), v(0)) &= (u_0, v(0)), \quad \forall v \in H_0^1(\Omega),\end{aligned}\quad (2)$$

non v deitu zaie test funtzioei, $\langle \cdot, \cdot \rangle$ notazioa erabili da $H_0^1(\Omega)$ espazioaren eta bere dualaren $H^{-1}(\Omega)$ arteko dualtasun-biderkadura adierazteko, eta $(\cdot, \cdot)$ erabili da $L^2(\Omega)$ -ko barne-biderkadura adierazteko. Espazio horiek honela definituta daude:

- Karratu integragarritun funtzioen espazioa: $L^2(\Omega) = \{g : \Omega \rightarrow \mathbb{R} \mid \int_{\Omega} g(x)^2 dx < +\infty\}$.
- Sobolev-en espazioa: $H^1(\Omega) = \{g \in L^2(\Omega) \mid g' \in L^2(\Omega)\}$.
- Sobolev-en espazioko $H_0^1(\Omega)$ azpiespazioa: $H_0^1(\Omega) = \{g \in H^1(\Omega) \mid g(x) = 0 \text{ izanik } \partial\Omega \text{ eremuan}\}$.
- Bochner-en espazioa: $L^2(I; V) = \{g : I \rightarrow V \mid g \text{ funtzioa } V - \text{neurgarria eta } \int_I \|g(t)\|_V^2 dt < +\infty\}$.

(2) problema diskretizatzeko, Ω eremuaren honako partiketa hau kontsideratuko dugu:

$$\begin{array}{ccccccc} | & & | & & | & & | \\ x_0 & & x_1 & & x_2 & & \cdots & & x_{n-1} & & x_n \end{array}$$

Espazioan zatika linealak diren funtzioak kontsideratuz, (2) problema honako EDA sistema honen baliokidea dela lortzen da:

$$\left\| \begin{array}{l} \text{Aurkitu } U, \text{ non:} \\ M \frac{dU}{dt} + KU = F, \end{array} \right. \quad (3)$$

M eta K masa- eta zurruntasun-matrizeak izanik, eta F indarren bektorea. Baldin eta $h := x_i - x_{i-1}$ bada, $\forall i = 1, \dots, n$, orduan, masa- eta eta zurruntasun-matrizeak honako hauek dira:

$$M = \begin{pmatrix} h/3 & h/6 & 0 & 0 & 0 & \dots & 0 & 0 \\ h/6 & 2h/3 & h/6 & 0 & 0 & \dots & 0 & 0 \\ 0 & h/6 & 2h/3 & h/6 & 0 & \dots & 0 & 0 \\ 0 & 0 & h/6 & 2h/3 & h/6 & \dots & 0 & 0 \\ \vdots & \vdots & \vdots & \vdots & \ddots & \vdots & \vdots & \vdots \\ \vdots & \vdots & \vdots & \vdots & \vdots & \ddots & \vdots & \vdots \\ 0 & 0 & 0 & 0 & \dots & h/6 & 2h/3 & h/6 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & \dots & 0 & h/6 & h/3 \end{pmatrix}, \quad (4)$$

$$K = \begin{pmatrix} 1/h & -1/h & 0 & 0 & 0 & \dots & 0 & 0 \\ -1/h & 2/h & -1/h & 0 & 0 & \dots & 0 & 0 \\ 0 & -1/h & 2/h & -1/h & 0 & \dots & 0 & 0 \\ 0 & 0 & -1/h & 2/h & -1/h & \dots & 0 & 0 \\ \vdots & \vdots & \vdots & \vdots & \ddots & \vdots & \vdots & \vdots \\ \vdots & \vdots & \vdots & \vdots & \vdots & \ddots & \vdots & \vdots \\ 0 & 0 & 0 & 0 & \dots & -1/h & 2/h & -1/h \\ 0 & 0 & 0 & 0 & \dots & 0 & -1/h & 1/h \end{pmatrix}. \quad (5)$$

(3) problemaren egonkortasun analisia egiteko, EDA sistema era honetan idatzi beharra dago:

$$\left\| \begin{array}{l} \text{Aurkitu } U, \text{ non:} \\ \frac{dU}{dt} = -M^{-1}KU + M^{-1}F. \end{array} \right. \quad (6)$$

Eta egonkortasuna ziurtatzeko, $\mathcal{A} = -M^{-1}K$ matrizearen autobalioak EDA askatzeko darabilgun zenbakizko metodoaren egonkortasun-eremuan egon beharko dute.

3.1. Runge-Kutta metodo esplizituak

s -ataleko Runge-Kutta metodoak era honetan emanda daude:

$$y_{n+1} = y_n + h \sum_{i=1}^s b_i k_i, \quad (7)$$

$$\text{non: } k_i = f(t_n + c_i h, y_n + h \sum_{j=1}^s a_{ij} k_j), \quad i = 1, 2, \dots, s. \quad (8)$$

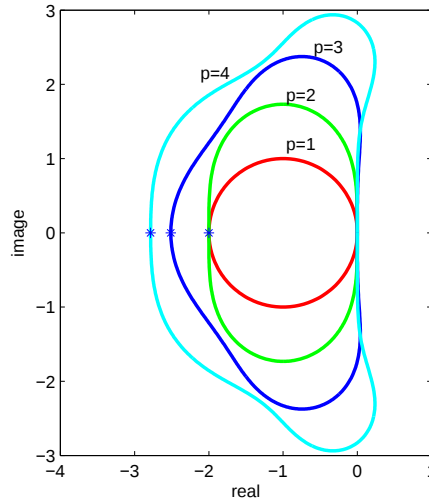
(7) eta (8) formuletako a_{ij} , b_i , c_i konstanteak Butcher taula batean jaso ohi dira. Butcher taularen matrize-adierazpena 1 taulan ikus daiteke, $\mathbf{b} = [b_1, b_2, \dots, b_s]^T$ eta $\mathbf{c} = [c_1, c_2, \dots, c_s]^T$, s dimentsioko bektoreak izanik eta $A = [a_{ij}]$, $s \times s$ dimentsioko matrizea.

1. taula. Butcher taularen matrize-adierazpena.

$$\begin{array}{c|c} \mathbf{c} & A \\ \hline & \mathbf{b}^T \end{array}$$

Atal kopurua (s) eta zehaztasun ordena (p) berdinak dituzten (hau da, $s = p$) Runge-Kutta esplizituen (eta hau $s = 1, 2, 3, 4$ kasuetan betetzen da) egonkortasun eremuak 1 irudian adierazi dira.

1. Irudia: Runge-Kutta metodo esplizituen egonkortasun eremua $s = p$ kasurako (kurben barneko aldean).



EDA sistema ebazteko aipatutako Runge-Kutta metodo esplizituak darabiltzagunean, (3) egonkorra izango da $\lambda \Delta t$ balioak metodoaren egonkortasun eremuan badaude; λ , $\mathcal{A}$ matrizearen autobalioa izanik. $\mathcal{A}$ matrizeak autobalio erreal negatiboak ditu. Beraz, Runge-Kutta metodo esplizituak darabiltzagunean modulurik handieneko autobalioak honako hau betetzea eskatuko dugu:

$$\tilde{a} < \lambda_{max} \cdot \Delta t < 0, \quad (9)$$

$\tilde{a}$ izanik egonkortasun eremuko ezkerreko mugaren x osagaia. 1 irudian, $\tilde{a}$ puntua “*” erabiliz adierazi da. $s = 1$ denean, $\tilde{a} = -2$ da; $s = 2$ denean, $\tilde{a} = -2$; $s = 3$ denean, $\tilde{a} = -2.512745326618328$; eta $s = 4$ denean, $\tilde{a} = -2.785293563405274$. Modulurik handieneko $\mathcal{A}$ matrizearen autobalioa $\lambda_{max} = -12/h^2$ denez, CFL baldintza honela geratzen da:

$$-\frac{12}{h^2} \cdot \Delta t > \tilde{a} \Leftrightarrow \frac{12}{h^2} \cdot \Delta t < -\tilde{a} \Leftrightarrow \frac{\Delta t}{h^2} < \frac{-\tilde{a}}{12}. \quad (10)$$

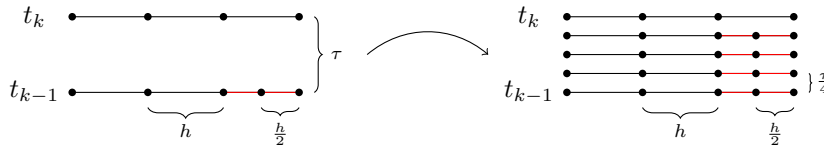
3.2. CFL baldintzan oinarritutako denboraren egokitzapena

Izan bedi h_k , espazioko sareko elementurik txikienaren tamaina t_k aldiunean. Orduan CFL baldintza hauxe litza-teke:

$$\frac{\tau_k}{h_k^2} < \frac{-\tilde{a}}{12} \text{ (problema dualerako), } \frac{\tau_{k+1}}{h_k^2} < \frac{-\tilde{a}}{12} \text{ (primalerako),} \quad (11)$$

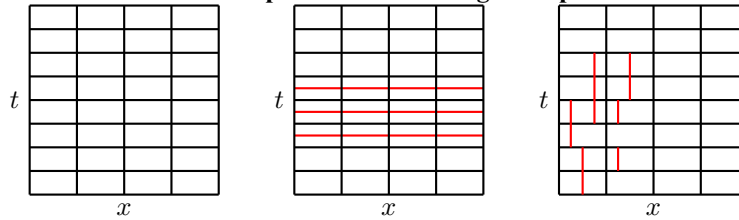
non $\tau_k = t_k - t_{k-1}$ eta $\tau_{k+1} = t_{k+1} - t_k$. Eta denborari dagokion sarea (11) baldintzaren arabera egokitu beharra dago. Behin espazioko sarea definituta dagoenean, CFL baldintza betetzen ez duten denbora tarteak identifikatu ditugu eta banatu egin ditugu, espazioaren diskretizazioko aldi bereko maila berriak sartuz (espazioko sareak). 2 irudian ikus daiteke denborako egokitzapen prozesua. (11) baldintzan h_k^2 agertzen denez, denbora tarteak 4 zatitan banatu behar da CFL baldintza bete dadin.

2. irudia. CFL baldintzan oinarritutako denboraren egokitzapena.



Egokitzapena independenteki burutzen da denboran (globalean) eta espazioan (lokalean), 3 irudian ikus daitekeen moduan.

3. irudia. Espazio-denborako egokitzapena.



4. Etorkizunerako planteatutako norabidea

Helburuetara orientatutako egokitzapena metodo esplizitu bidez egiteak egonkortasun baldintza betetzera behar-tzen gaitu. Honek esan nahi du darabilgun metodoari dagokion CFL baldintza kalkulatu beharko dela eta espazio-denbora sareak baldintza hori bete beharko duela. Egonkortasun baldintza bete nahi bada, sarearen egokitzapena nola egin aztertu dugu. Lan honetan espazio-denbora sarea independenteki egokitu da: denboran (globalean) eta espazioan (lokalean). Etorkizunera begirako lana izan daiteke bai espazioan eta bai denboran fintze lokalak egitea, denboran esplizituak diren metodoen baliokideak diren espazio-denborako EFMak erabiliz.

5. Erreferentziak

- Abedi, Reza, Boris Petracovici, eta Robert B Haber. 2006. A space-time discontinuous Galerkin method for linearized elastodynamics with element-wise momentum balance. *Computer Methods in Applied Mechanics and Engineering* 195.3247–3273.
- Ahmed, Naveed, eta Volker John. 2015. Adaptive time step control for higher order variational time discretizations applied to convection-diffusion-reaction equations. *Computer Methods in Applied Mechanics and Engineering* 285.83–101.
- Alberdi, Elisabete, eta Juan Jose Anza. 2014. Solution of the wave-type PDE by numerical damping control multistep methods. *Procedia Computer Science* 29.779–789.
- Almeida, Regina C, eta J Tinsley Oden. 2010. Solution verification, goal-oriented adaptive methods for stochastic advection–diffusion problems. *Computer Methods in Applied Mechanics and Engineering* 199.2472–2486.
- Alvarez-Aramberri, Julen, eta David Pardo. 2017. Dimensionally adaptive hp-finite element simulation and inversion of 2D magnetotelluric measurements. *Journal of Computational Science* 18.95–105.

- Bangerth, Wolfgang, Michael Geiger, et al Rolf Rannacher. 2010. Adaptive Galerkin finite element methods for the wave equation. *Computational Methods in Applied Mathematics* 10.3–48.
- , et al Rolf Rannacher. 2001. Adaptive finite element techniques for the acoustic wave equation. *Journal of Computational Acoustics* 9.575–591.
- Becker, Roland, et al Rolf Rannacher. 1996. *Weighted a posteriori error control in FE methods*. IWR.
- Besier, Michael, et al Rolf Rannacher. 2012. Goal—oriented space–time adaptivity in the finite element Galerkin method for the computation of nonstationary incompressible flow. *International Journal for Numerical Methods in Fluids* 70.1139–1166.
- Chamoin, Ludovic, et al Pierre Ladevèze. 2008. A non-intrusive method for the calculation of strict and efficient bounds of calculated outputs of interest in linear viscoelasticity problems. *Computer Methods in Applied Mechanics and Engineering* 197.994–1014.
- Collier, Nathan, Hany Radwan, Lisandro Dalcin, et al Victor M Calo. 2013. Time adaptivity in the diffusive wave approximation to the shallow water equations. *Journal of Computational Science* 4.152–156.
- Darrigrand, Vincent, David Pardo, et al Ignacio Muga. 2015. Goal-oriented adaptivity using unconventional error representations for the 1D Helmholtz equation. *Computers & Mathematics with Applications* 69.964–979.
- , Ángel Rodríguez-Rozas, Ignacio Muga, David Pardo, Albert Romkes, et al Serge Prudhomme. 2018. Goal-oriented adaptivity using unconventional error representations for the multidimensional Helmholtz equation. *International Journal for Numerical Methods in Engineering* 113.22–42.
- Díez, Pedro, et al Giovanni Calderón. 2007. Goal-oriented error estimation for transient parabolic problems. *Computational Mechanics* 39.631–646.
- Erickson, Jeff, Damrong Guoy, John M Sullivan, et al Alper Üngör. 2005. Building spacetime meshes over arbitrary spatial domains. *Engineering with Computers* 20.342–353.
- Gopalakrishnan, Jay, Peter Monk, et al Paulina Sepúlveda. 2015. A tent pitching scheme motivated by Friedrichs theory. *Computers & Mathematics with Applications* 70.1114–1135.
- Hussain, Shafqat, Friedhelm Schieweck, et al Stefan Turek. 2011. Higher—order Galerkin time discretizations and fast multigrid solvers for the heat equation. *Journal of Numerical Mathematics* 19.41–61.
- Köcher, Uwe, et al Markus Bause. 2014. Variational space-time methods for the wave equation. *Journal of Scientific Computing* 61.424–453.
- Mathelin, Lionel, et al Olivier Le Maître. 2007. Dual-based a posteriori error estimate for stochastic finite element methods. *Communications in Applied Mathematics and Computational Science* 2.83–115.
- Miller, Scott T, et al Robert B Haber. 2008. A spacetime discontinuous Galerkin method for hyperbolic heat conduction. *Computer Methods in Applied Mechanics and Engineering* 198.194–209.
- Muñoz-Matute, Judit, David Pardo, Victor M Calo, et al Elisabete Alberdi. 2018. Variational formulations for explicit Runge-Kutta methods. *arXiv preprint arXiv:1806.07803*.
- Oden, John Tinsley, et al Serge Prudhomme. 2001. Goal-oriented error estimation and adaptivity for the finite element method. *Computers & Mathematics with Applications* 41.735–756.
- Pardo, D, L Demkowicz, C Torres-Verdin, et al M Paszynski. 2007. A self-adaptive goal-oriented hp-finite element method with electromagnetic applications. Part II: Electrodynamics. *Computer methods in applied mechanics and engineering* 196.3585–3597.
- , L Demkowicz, C Torres-Verdín, et al L Tabarovsky. 2006a. A goal-oriented hp-adaptive finite element method with electromagnetic applications. Part I: Electrostatics. *International Journal for Numerical Methods in Engineering* 65.1269–1309.
- Pardo, David, Leszek Demkowicz, Carlos Torres-Verdín, et al Maciej Paszynski. 2006b. Simulation of resistivity logging-while-drilling (LWD) measurements using a self-adaptive goal-oriented hp-finite element method. *SIAM Journal on Applied Mathematics* 66.2085–2106.
- Prudhomme, Serge, et al J Tinsley Oden. 2003. Computable error estimators and adaptive techniques for fluid flow problems. *Error Estimation and Adaptive Discretization Methods in Computational Fluid Dynamics* 25.207–268.
- Schiesser, William E. 2012. *The numerical method of lines: integration of partial differential equations*. Elsevier.

- Schieweck, Friedhelm. 2010. A-stable discontinuous Galerkin—Petrov time discretization of higher order. *Journal of Numerical Mathematics* 18.25–57.
- Schötzau, Dominik, eta Christoph Schwab. 2000a. An hp a priori error analysis of the DG time-stepping method for initial value problems. *Calcolo* 37.207–232.
- , eta Christoph Schwab. 2000b. Time discretization of parabolic problems by the hp-version of the discontinuous Galerkin finite element method. *SIAM Journal on Numerical Analysis* 38.837–875.
- Strang, Gilbert. 1968. On the construction and comparison of difference schemes. *SIAM Journal on Numerical Analysis* 5.506–517.
- Van der Zee, KG, EH Van Brummelen, I Akkerman, eta R De Borst. 2011. Goal-oriented error estimation and adaptivity for fluid–structure interaction using exact linearized adjoints. *Computer Methods in Applied Mechanics and Engineering* 200.2738–2757.
- Vignal, Philippe, N Collier, Lisandro Dalcin, DL Brown, eta V M Calo. 2017. An energy-stable time-integrator for phase-field models. *Computer Methods in Applied Mechanics and Engineering* 316.1179–1214.
- Werder, Thomas, Klaus Gerdes, Dominik Schötzau, eta Christoph Schwab. 2001. hp-discontinuous Galerkin time stepping for parabolic problems. *Computer Methods in Applied Mechanics and Engineering* 190.6685–6708.

6. Eskerrak

Autore guztiek “Union’s Horizon 2020 research and innovation” programako dirulaguntza jaso dute, Marie Skłodowska-Curie No. 777778 erreferentziaduna.

Lehenengo hiru autoreak Euskal Gobernuako Ikerketa Talde Kontsolidatuak (IT649-13 Mathematical Modeling, Simulation, and Industrial Applications M2SI), eta Espainiar Gobernuako Ekonomia eta Lehiakortasun Ministeritzako MTM2016-76329-R (AEI/FEDER, EU), eta MTM2016-81697-ERC/AEI erreferentzia zenbakidun proiektuek partzialki diruz lagunduak izan dira.

David Pardok BCAM-eko “Severo Ochoa” bikaintasun akreditazioko SEV-2013-0323 eta Euskal Gobernuako BERC 2014-2017 programako laguntzak ere jaso ditu.

Victor M. Calo Curtin Unibertsitateko CSIRO Professorial Chair in Computational Geoscience-ek partzialki diruz lagundua izan da. Errusiako Gobernuaren (N 14.Y26.31.0013) eta Commonwealth Scientific Industrial Research Organisation-eko Deep Earth Imaging Enterprise Future Science Platforms-eko dirulaguntzak ere jaso ditu.

Judit Muñoz Matutek Euskal Herriko Unibertsitateko dirulaguntza ere jaso du, No. PIF15/346.

Piriniotako muturluzearen (*Galemys pyrenaicus*) ekologia eta emari ekologikoen berrikuspena

Esnaola, Amaiur¹; González-Esteban, Jorge²; Elozegi, Arturo³ eta Aihartza, Joxerra¹

¹Zoologia eta Animalia Zelulen Biologia, Zientzia eta Teknologia Fakultatea, Euskal Herriko Unibertsitatea UPV/EHU

²DESMA Estudios Ambientales, Sunbila, Nafarroa

³Landareen Biologia eta Ekologia Saila, Zientzia eta Teknologia Fakultatea, Euskal Herriko Unibertsitatea UPV/EHU
amaiur.esnaola@ehu.eus

Laburpena

Askorentzat ezezaguna izan arren, Euskal Herriko erreka garbietako harribitxietako bat dugu Piriniotako muturluzea edo ur-satorra. Satorren familiako intsektiboro erdi-urtar hau atzerakada nabarmena ari da pairatzen bere banaketa-eremu osoan eta kudeaketa eraginkor baten beharra du. Jakin bagenekien ur-lasterrak zituela gustuko, baina hautespen hori bazka-kopuruarekin azaldu ote zitekeen aztertu nahi genuen. Horretarako muturluzearen dieta eta harrapakin-hautespena zehaztu genituen, gorotzak genetikoki aztertuz. Orokorrean, muturluzearen beharrian ekologikoak bermatzeko ur-lasterrak faboratzearen eta emari ekologikoak berrikustearren beharra erakusten du gure lanak. Ikerketa honen emaitzak funtsezkoak izango dira espeziearen kontserbazioaren alde pausoak emateko.

Hitz gakoak: dieta-hautespena, habitat-hautespena, kontserbazioa, ur erauzketak, ur-satorra

Abstract

The Pyrenean desman is a special animal in the Basque Country, although it is still unknown to many people. It is a semi-aquatic insectivore mammal from the same family of the mole. In last ten decades it is in a state of regression in most of its distribution area, what makes it need a proper management. We knew that they prefer riffles, but we wanted to know whether that selection could be explained by the food available. We also tried to describe desmans diet and prey selection, by genetically analyzing its faeces. In general, our work talks about the importance of favoring the riffles and reviewing the ecological flows. The results of this research will be essential to take steps towards the species conservation.

Keywords: conservation, desman, diet selection, habitat selection, water diversions

1. Sarrera

Piriniotako muturluzea edo ur-satorra, *Galemys pyrenaicus* (E. Geoffroy Saint-Hilaire, 1811), ugaztun intsektiboro erdi-urtarra da, satorraren familiakoa (1. irudia). Bizimodu gautarra duen animalia hau ur garbi eta ondo oxigenaturiko mendiko erreketan bizi da, Iberiar Penintsulako iparraldean eta Pirinioen bi aldeetan. Bizitzeko funtsezko zaion faktore nagusia urte guztian zeharreko ur-fluxu erregularra da eta horregatik klima mediterranearrak baino ozeanikoak ditu nahiago. Bere presentzia altitudeak baino ibaien maldak, sakonerak eta korrontearren abiadurak baldintzaturik dago, eta 450 eta 600 metroko luzerako bizi-eremuak erabiltzen dituela estimatzen da (Nores, 2012). Azken hamarkadetan %50 baino gehiago murriztu da muturluzearen banaketa-eremua (MAGRAMA, 2013; Charbonnel, 2015) eta horrek IUCNren espezie mehatxatuen katalogo eta zerrenda gorrian Zaurgarri gisa barneratzea ekarri du (A2ac+3c+4ac; Fernandes et al., 2008). Kezkatzekoa dena zera da: egoera ekologikoa hobetzen doan ibaietan ere muturluzearen populazioa murriztu egin dela. Balizko kausen artean, metapopulazioen zatiketa, habitataren andeaketa eta bazka-eskasia aipatu izan dira (Nores, 2012). Dena den, ez dago gainbeheraren diagnostiko argi bat eta horrek kudeaketa-plan eraginkorren diseinua eragozten du.

Orokorrean, muturra da animalia honen egitura morfologikorik bereizgarriena: elefanteen tronparen antzeko egitura du haren sudurrak, eta honen amaieran irekitzen dira bi sudur-zuloak. Muturluzeak, haren ahaide den satorrak ez bezala, uretan igeri egiteko moldatua du gorputza: igeriketa errazteko ahateen antzerako mintz interdigitala dute hatzen artean eta oso garatuak ditu atze-hankak. Aurre-hankak osterak ez daude zulaketarako moldatuta: atzapar sendoak dituzte

urpeko substratura ongi eusteko. Amaiera aldean lateralki zapaldua du isats luze ezkataduna, lema funtzioa betetz. Ur-satorraren gorputzak izatez kolore arrea badu ere, urpean brontzezko eta zilarrezko distira metalikoak islatzen ditu.

1. irudia. Piriniotako muturluzea edo ur-satorra (Argazkia: Jorge González-Esteban).



Muturluzeak ornogabe urtarrak ditu elikaduraren oinarri: erlatiboki tamaina handia duten (adb. trikopteroak) edo tamaina txikiagoa izan arren, ugariak diren (adb. efemeropteroak) ornogabe bentikoez elikatzen da (Bertrand, 1993; Castién eta Gosálbez, 1995). Egun muturluzearen dieta gorotzen analisi genetikoen bitartez aztertzen da (Biffi et al., 2017), nahiz eta erabili izan diren metodologiak findu beharra dagoen (Esnaola et al., 2018a). Gorotzetako DNA aztertearen abantaila nagusia zera da, gorotzetan begiz bereizi ezin diren harrapakinen hondakinak (zizare gisako ornogabe bigunena adibidez) identifikatu ahal izatea. Desabantailak ere baditu metodologia berritzaile honek, ordea: lanerako tresnak eta protokoloak fintzearen beharra, oraindano estandarizaziorik eza, harrapakinen harrapakinak (liseri-aparatuko hondarrak) harrapariaren dietaren parte hartzearen akatsa eta laginak kutsatzeko arriskua, besteak beste.

Muturluzearen habitatean substratu lodiak (bereziki uharri eta harritzarrak) nagusi izaten dira eta nekez behatzerik izango da muturluzerik gun e buztintsuetan. Nores eta kideen (1992) habitataren analisisiek ubide estuak (1 m baina estuagoak eta ur gutxikoak) saihesten dituela frogatu zuten: ibai handiak nahiago izan arren, 70 cm baino sakonagoak diren ibilguak ere saihestu egiten omen ditu. Santamariak (1995) bestalde, kutsadura-maila baxuak jasateko gaitasuna izan arren ur kutsatuak ere saihestu egiten dituela erakutsi zuen. Berriki egindako ikerketa batean ikusi dugu ur-lasterrekiko hautua egiten duela muturluzeak ur bare eta putzuen aldean (Esnaola et al., 2018b). Ekologia espazialari dagokionean, beraz, espezie erreofilo espezialista dela esan dezakegu. Habitat mailako hautespen hori gainera handiagoa da ibaiaren egoera ekologikoa okertu ahala, itxuraz, muturluzearen gustuko ez diren ur geldoak are desagokiagoak egiten dituztelako zentral hidroelektrikoek eragindako emari-aldaketek eta basogintzaren ondorioz ibaira iristen diren sedimentu finek. Ez dakiguna zera da, zergatik pasatzen duten denbora gehiago ur-lasterretan: habitata bera ala bertan duen bazka da muturluzeak hautatzen duena? Dieta-azterketa sakon baten laguntzaz jakiterik dugu hori.

Gorago aipatu bezala, urtegi eta zentral hidroelektrikoen presentziaren eraginez ibaietatik ura erauztea da animalia honen mehatxu faktore nagusietako bat (Nores, 2007). Ezezagun zaigu ordea emari-aldaketek nola eragiten duten muturluzearen ekologian. Aurresan genezake ur-lasterren kopurua handitu egingo dela emaria haztearekin batera, baina ez dago argi ur-erauzketek nola eragiten dioten ur-lasterren ugaritasunari. Animalia hau presente dagoen erreketan zein emari minimo ezarri beharko genukeen ere ez dakigu. Horren guztiaren inguruko ezagumenduan sakontzea ezinbestekoa da espeziearen kudeaketa egoki bat aurrera eraman ahal izateko.

2. Ikerketaren helburuak

Ikerketa honen helburu orokorra kudeaketa-plan eraginkor bat martxan jarri ahal izateko ur-satorraren beharrian ekologikoak aztertzea da. Horretarako, lehen helburua espezie honen dieta

zehaztea da. Bigarren helburua, bestalde, dieta ornogabeen eskuragarritasunarekin alderatuz harrapakin-hautespena aztertzea da, ur-lasterrekiko zaletasuna hobetsitako ornogabeen eskuragarritasunak azaltzen ote duten ikusiz. Hirugarren helburua, azkenik, emari-aldaketek ur-lasterren eskuragarritasunean nola eragiten duten aztertzea da. Honek, espeziearen kontserbaziorako kudeaketa-egitasmoak egikaritzeko ezinbestekoa den emari ekologikoen gogoetari bidea irekiko dio.

2.1. Hipotesiak

Piriniotako muturluzeak ur-lasterrekiko duen zaletasuna bertan agertzen diren ornogabeek azaltzen dutela espero da. Horretarako, habitaten artean bazka-eskuragarritasun ezberdinak egongo direla aurrikusten da. Era berean, muturluzeak dieta jeneralista izango duela estimatzen da, ornogabe-talde ugaziz bazkatuz.

Emari-aldaketei dagokienean, emaria murriztu ahala muturluzearen habitat egokiena (ur-lasterrek) murriztuz joango dela auresaten da. Are gehiago, ur-lasterren eskuragarritasunak emariarekin duen erlazioa aztertzean, haustura-punturen bat azaltzea espero da. Puntu horrek emari ekologikoa markatuko du, alegia, emari batetik behera ur-lasterren ugartasuna neurrigabe murriztea dakarren puntua aurkitu ahal izango da.

3. Ikerketaren muina eta ondorioak

3.1. Dieta

Muturluzearen dieta aztertzeko teknika molekularrak erabili genituen. Horretarako, ur-satorrarentzako gorotz-leku bereziak diseinatu (González-Esteban et al., 2018) eta gorotzak bildu genituen 2016ko iraila eta urrian, Leitzaran (Oria ibaiaren arroa, Gipuzkoa) eta Elama (Urumea ibaiaren arroa, Nafarroa) ibaietan. Leitzaran ibaia egoera ekologiko onean dago, baina zentral hidroelektriko ugariaren eragin nabarmena jasaten du, bere agorraldiak naturalak baino askoz luzeagoak izanik. Elama erreka, bestalde, Euskal Herrian hobekien kontserbatutakoen artean dago, azken ia ehun urtetan apenas izan baita giza-ekintzarik haren arroan. 94 gorotz fresko bildu genituen ibai bakoitzean (188 denera) eta Eppendorf hodietan gorde %98-ko etanolean. Ondoren, -80°C-tan izoztuta gorde genituen laginak laborategiko lanari ekin arte.

Gorotzetako DNA erauzteko Qiagen Powerfecal DNA kit (Qiagen Iberia, S.L. Madrid) erabili genuen. Erauzitako DNA aldeztetik testatutako (Esnaola et al., 2018a) bi haslerekin (Gillet et al., 2015; Zeale et al., 2011) anplifikatu ostean sekuentziatu egin genuen *Illumina MiSeq NGS platform* batean. Gorotzetako DNA erauzteaz gain, guk bildutako ornogabe batzuen DNA ere erauzi, anplifikatu eta sekuentziatu genuen, datu-base propioa eraikitze asmoz. Lan bioinformatikoekin lortutako sekuentziak tratatu ostean OTU (*Operational Taxonomic Units*) taula eraiki genuen, antzeko sekuentziak elkartzuz. OTU horiei espezieak esleitu eta muturluzearen dieta zehazteko bi datu-base kontsultatu genituen (Genbank eta Bold). Muturluzea bera ere gorotz orotan identifikatu genuen, gorotzen egilea bera zela baieztatuz.

Emaitzek erakutsi zuten efemeropteroak, dipteroak, anfipodoak eta trikopteroak zirela muturluzeen gorotz gehienetan agertzen ziren harrapakinak (186, 176, 172, eta 164 gorotzetan, hurrenez hurren), eta hortaz, haiek zirela maizen kontsumitutakoak. Familia ohikoenak heptagenidoak, gamaridoak, baetidoak eta simulidoak izan ziren (176, 172, 170 eta 168 gorotzetan agertuak, hurrenez hurren). Emaitzak ibaien arabera aztertuz ordea, ezberdintasun nabarmenak ageri ziren. Odontozeridoak, perlidoak, leptoflebidoak eta ibai-karramarroak ziren ezberdintasun nagusienak (lehenengo hirurak eskuarki jan zituzten Elaman eta azkena berriz Leitzaranen).

3.2. Dieta-hautespena

Dieta-hautespena aztertzeko, lehenik eta behin, bazka-eskuragarritasuna ezaugarritu genuen ibai bakoitzean. Horretarako, hamar ornogabe-lagin bildu genituen habitat bakoitzeko (10 ur-lasterretan, 10 ur bareetan eta 10 putzuetan) Elaman, eta beste hainbat Leitzaranen, Surber sare baten bidez (30 cm x 30 cm, 1 mm-ko sarea). Laginak %75-eko etanoletan gorde genituen laborategian ornogabeak identifikatu eta neurtu arte. 2 mm baino handiagoak ziren ornogabeak

identifikatzeaz gain zenbatu eta neurtu ere egin genituen, dibertsitate, dentsitate eta biomasa kalkulatzeko. Harrapakin gehienak espezie-mailaraino identifikatu bagenituen ere, zailtasun ezberdinak tarteko, talde batzuk (dipteroak, koleopteroak, oligoketoak, hirudinidoak eta nematodoak) familia- edo orden-mailan utzi genituen. Espero genezakeenaren kontra, bazka eskuragarria ez zen modu esangarrian aldatzen habitaten artean. Emaiza horretatik ondorioztatu dezakegu muturluzeak ur-lasterrak hobesten baditu, ez dela bazkarengatik. Agian hautespena flotagarritasunean aurkitu genezake, ur sakon eta geldoetan animaliak lan gehiago egin behar izaten baitu hondora iritsi eta han bazka bila mantentzeko (Richard, 1986).

Muturluzearen bazka-hautespena ezagutzeko bigarren pausoa dieta bera eta eskuragarri zuten bazka alderatzea izan zen. Eskuragarri zutenarekiko proportzio handiagoan kontsumitu zituzten harrapakin batzuk (hautespen positiboa) eta proportzio txikiagoan (hautespen negatiboa) beste batzuk (1. Taula). Positiboki hautaturikoen artean honako ezaugarriak dituzten ornogabe urtarrak sailkatu genitzake: harrien gainean bizi direnak (simulidoak, baetidoak eta heptagenidoak) eta materia organiko lodiarri loturikoak (gamaridoak, odontozeridoak, leptoflebidoak, limnefilidoak eta leuktridoak). Negatiboki hautaturikoen artean ordea ondorengoak leudeke: substratu finen barnean bizi direnak (aterizidoak, limonidoak, naididoak eta lunbrizidoak), oskol gogordunak (goeridoak eta planorbidoak) eta harrapari diren beste zenbait (perlidoak, polizentropodidoak eta riakofilidoak). Azken talde honekiko hautespen negatiboa ornogabeen defentsa-mekanismoren batekin (adibidez ihes egitearekin) loturik egon litekeela uste dugu. Dena den, hautespena hobe ulertzeko ezinbestekoa izango da harrapakinaren ezaugarrien (*trait*-en) arabera ikerketa sakonago bat egitea.

1. taula. Muturluzeek eskuragarri zutenarekiko proportzioan gehiago (positiboki hautatuak) eta gutxiago (negatiboki hautatuak) jandako taxoiak, ibai bakoitzean eta denera. Parentesi artean gehitu da hautespen-indizearen balioa.

Hautespena	Elama Ibaia	Leitzaran Ibaia	Denera
Positiboa	<u>Anfipodoak</u> Gamaridoak (0.45) <u>Dipteroak</u> Simulidoak (0.87) Sikodidoak (0.50) Kironomidoak (0.20) <u>Efemeropteroak</u> Baetidoak (0.81) Heptagenidoak (0.30) Leptoflebidoak (0.22) <u>Plekopteroak</u> Leuktridoak (0.20) <u>Trikopteroak</u> Hidropsikidoak (0.27) Limnefilidoak (0.20) Odontozeridoak (0.45)	<u>Dipteroak</u> Simulidoak (0.75) Sikodidoak (0.70) <u>Efemeropteroak</u> Heptagenidoak (0.23) <u>Trikopteroak</u> Riakofilidoak (0.22)	<u>Anfipodoak</u> Gamaridoak (0.22) <u>Dipteroak</u> Simulidoak (0.81) Sikodidoak (0.60) <u>Efemeropteroak</u> Baetidoak (0.48) Heptagenidoak (0.22) <u>Trikopteroak</u> Odontozeridoak (0.22)
Negatiboa	<u>Dipteroak</u> Aterizidoak (-0.25) Limonidoak (-0.30) <u>Plekopteroak</u> Perlidoak (-0.20) <u>Trikopteroak</u> Goeridoak (-0.36) Riakofilidoak (-0.22)	<u>Dipteroak</u> Aterizidoak (-0.55) <u>Gastropodoak</u> Planorbidoak (-0.35) <u>Oligoketoak</u> Lunbrizidoak (-0.30) Naididoak (-0.20) <u>Plekopteroak</u> Perlidoak (-0.40) <u>Trikopteroak</u> Goeridoak (-0.20) Polizentropodidoak (-0.39)	<u>Dipteroak</u> Aterizidoak (-0.40) <u>Gastropodoak</u> Planorbidoak (-0.22) <u>Plekopteroak</u> Perlidoak (-0.30) <u>Trikopteroak</u> Goeridoak (-0.28)

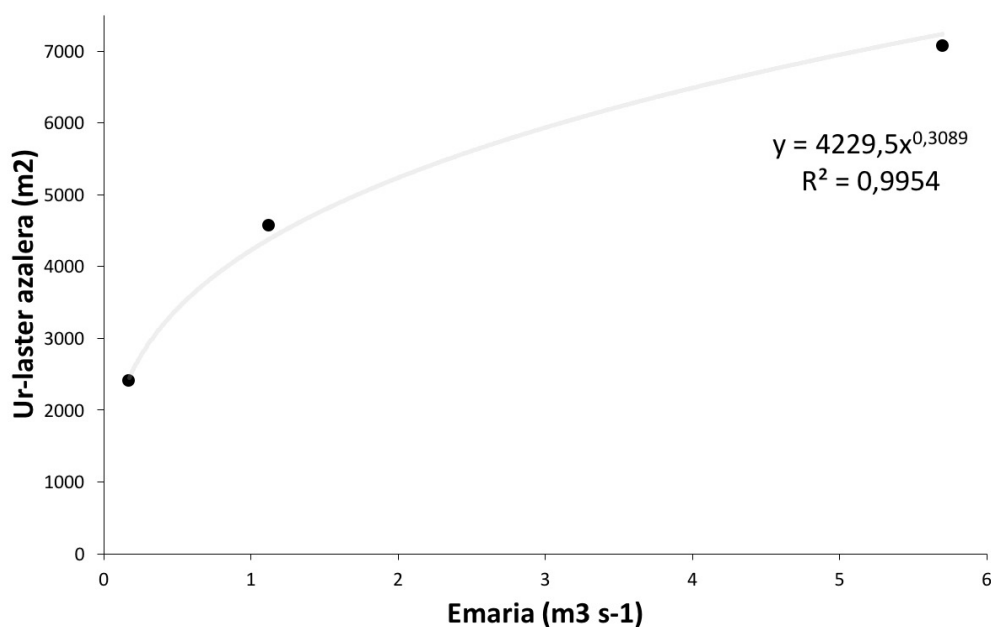
Orokorrean, dietari dagokionean espezie jeneralista da muturluzea, harrapakin-taxoi ugari bazkatzen baita. Halaz ere, harrapakinak hautatu egiten ditu, batzuk eskuragarritasunaren gainera (hautespen positiboa), eta beste batzuk azpitik (hautespen negatiboa) ustiatzen baititu.

Dieta-hautespena, ordea, ezberdina izan zen ibai bakoitzean. Elaman, Leitzaranen ez bezala, materia organiko lodiari loturiko ornogabeen (nagusiki zatitzaileen) aldeko hautu nabarmena egin zuten ur-satorrek. Hori ulertzeko azalpen posible bat ibaiak materia organikoa atxikitze duen gaitasunean bilatu genezake. Elama osasun-egoera hobean dagoen erreka da eta bertan materia organikoaren erretentzioak ugariak dira. Hosto, adaxka zein enborren pilaketetan ornogabe zatitzaile gehiago agertzen dira, eta badirudi hauek muturluzearen gustukoak direla. Leitzaranen ordea zailagoa da materia organiko pilaketak topatzea. Bertan, jarduera hidroelektrikoaren eraginezko etenik gabeko emari-aldaketek ez dute ibaiaren dinamika naturala errespetatzen eta horrek zaildu egiten du ibaiaren heterogeneotasuna mantentzea. Elaman muturluzeek jarrera selektiboagoa azaltzen zutela esan genezake, dietan pisu handia baitzuten materia organikoari loturiko ornogabe horiek. Leitzaranen ordea, familia horien presentziarik ez zegoenez, beste harrapakin batzuk hautatzera jotzen zuten muturluzeek. Muturluzeen jarrera oportunistagoa zen bertan. Emaitzek iradokitzen dutenez, materia organiko lodiaren atxikipena handiagoa den kasuetan mokofinagoak dira muturluzeak.

3.3. Ur-lasterrek eta emari ekologikoen azterketa

Emari-aldaketekin muturluzeek gehien erabiltzen duten habitataren azalera nola aldatzen den ikusteko, Ameraungo zentral hidroelektrikoaren eraginpean dagoen ibai tarte bat karakterizatu zen Leitzaranen, emari ezberdineko hiru egunetan. Hasteko, 500 m-ko ibai-tartea kartografiatu zen LIDAR irudiaren gainean. Egun bakoitzean metroz neurtu ziren habitat-mota bakoitzaren luzera eta zabalerak, habitat bakoitzaren azalera totalen estimak kalkulatu ahal izateko. Emaitzetan, emaria haztearekin batera ur-lasterren azalera nabarmen handitzen zirela ikusi zen. 2. irudian ikus daitekeen bezala $1,123 \text{ m}^3/\text{s}$ -ko puntutik behera nabarmen jaisten da ur-lasterren azalera eta horregatik puntu horretan zehaztu dugu gure emari ekologiko hipotetiko.

2. irudia. Leitzarango ibai tarte berean, emari ezberdineko hiru egunetan ur-lasterren azalera nola aldatzen den erakusten duen grafikoa.



Andoaingo aforoko azken 15 urteetako eguneroko emari naturalen datuak aztertuta ikusi dugu egunen %41-ean dela emari naturala hori baina baxuagoa. Gure puntua baina gorago Ameraungo zentral hidroelektrikoaren deribazio-kanala irteten da ordea eta egunean 3000 L ur erauzteko baimena du honek. Horregatik, zentrala egunero martxan egongo balitz (maximora) emari-aldaketek gure puntuko ur-lasterren eskuragarritasunean nola eragingo luketen azertu genuen. Ikusi genuen egunen %84ean $1,123 \text{ m}^3/\text{s}$ baina baxuagoa izango litzatekeela gure puntuko emaria, hau da naturalki lortutakoaren bikoitza. Horrek erakusten digu zentrala martxan egoteak erdira jaitsi dezakeela guk ezarritako emari ekologiko hipotetiko hori gaingitzen duten

egun kopurua. Emaiza hauek hiru egunetako datuekin soilik egin badira ere, nabarmena da urerauzketek izan dezaketen eragina.

3.4. Ondorioak

Ur-lasterretan bazkatzera moldaturiko ugaztun erdi-urtarra da muturluzea, habitat-espezialista izan arren, dieta jeneralista duena. Dieta-hautespena aldiz aldakorra da ibaien egoera ekologikoaren arabera: jarrera selektiboagoa aurkezten du materia organiko lodia pilatzeko gaitasun handiago duen ibaian, bertan agertzen diren ornogabeak hautetsiz, eta oportunistagoa ordea egoera latzagoetan. Leitzaranean, zentral hidroelektrikoetako giza-jardueraren eraginez emaria artifizialki aldatzeak ibaien erregimen naturala aldatu eta habitat-baldintzak oso aldakorak izatea dakar, bertako bizitza zailduz.

Ur-satorrek ur-lasterak hautatzen dituztela ikusirik, ezinbestekoa da ibaien ur-laster kopurua faboratu eta haien dinamika naturala bermatzea. Horretarako, funtsezkoa da kudeaketa lan egokiak martxan jarri eta emari ekologikoa ur-satorren beharrianen arabera erregulatzea.

4. Etorkizunerako planteatzen den norabidea

4.1. Harrapakin-hautespena

Goiko lerroetan ezaugarritutako dieta-hautespena hobeto ulertzeko harrapakinen *trait*-en arabeko dieta-hautespen sakonagoa egitea izango da lehenengo pausoa. Ikerketa horrek baimenduko digu hain zuzen ere muturluzearen harrapakin-hautespenaren atzean ezkutatzen dena ezagutzea. Zentzu horretan, interesgarria izan liteke muturluzeak harrapakinak nola hautematen dituen ikertzea: zein zentzumenen arabera jarduten du muturluzeak? Asko dira oraindik ere erantzuteke dauden galderak.

4.2. Ur-lasterren eta emari ekologikoen azterketa

Muturluzearen beharrian ekologikoak baimenduko dituen emari ekologikoen inguruko lan pilotu bat egin den arren, ezinbestekoa izango da azterketa sakonagoak egiten jarraitzea. Izan ere, lehenik eta behin emari-aldaketek ur-lasterren kopuruan nola eragiten duten jakiteko ikerketa sakonago bat egin beharra dago. Bestalde, zentral hidroelektrikoen jarduerak horretan nola eragiten duen aztertu behar da, horrek ekarriko lituzkeen ondorioak aurreikusiz.

5. Erreferentziak

- Bertrand, A. (1993). Strategies alimentaires du Desman des Pyrénées *Galemys pyrenaicus* dans un cours d'eau des Pyrénées Françaises, in: *Proceedings of the Meeting on the Pyrenean Desman*. Serviço de Parques, Reservas e Conservação da Natureza – Museu Nacional de Historia Natural, Lisboa, Portugal.
- Biffi, M., Gillet, F., Laffaille, P., Colas, F., Aulagnier, S., Blanc, F., Galan, M., Tiouchichine, M.-L., Némot, M., Buisson, L. eta Michaux, J.R. (2017). Novel insights into the diet of the Pyrenean desman (*Galemys pyrenaicus*) using next-generation sequencing molecular analyses. *Journal of Mammalogy*, 98(5): 1497-1507.
- Castién, E. eta Gosálbez, J. (1995). Diet of *Galemys pyrenaicus* (Geoffroy, 1811) in the North of the Iberian Peninsula. *Netherlands Journal of Zoology*, 45(3-4): 422-430.
- Charbonnel, A. (2015). *Influence multi-échelle des facteurs environnementaux dans la répartition du Desman des Pyrénées (Galemys pyrenaicus) en France*. Institut National Polytechnique de Toulouse (INP-T), Université de Toulouse, Doktorego Tesia, 260 or.
- Esnaola, A., Arrizabalaga-Escudero, A., González-Esteban, J., Elozegi, A. eta Aihartza, J. (2018a). Determining diet from faeces: selection of metabarcoding primers for the insectivore Pyrenean desman (*Galemys pyrenaicus*). *PLoS ONE*, 13(12), e0208986.
- Esnaola, A., González-Esteban, J., Elozegi, A., Arrizabalaga-Escudero, A. eta Aihartza, J. (2018b). Need for speed: Preference for fast-flowing water by the endangered semi-aquatic Pyrenean desman (*Galemys pyrenaicus*) in two contrasting streams. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*, 28(3), 600-609.
- Fernandes, G., Herrero, J., Aulagnier, S. eta Amori, G. (2008). *Galemys pyrenaicus*, in *The IUCN Red List of Threatened Species* [<http://www.iucnredlist.org>]. 2015-3 bertsioa.

- Gillet, F., Tiouchichine, M.-L., Galan, M., Blanc, F., Némot, M., Aulagnier, S. eta Michaux, J.R. (2015). A new method to identify the endangered Pyrenean desman (*Galemys pyrenaicus*) and to study its diet, using next generation sequencing from faeces. *Mammalian Biology*, 80(6), 505-509.
- González-Esteban, J., Esnaola, A. eta Aihartza, J. (2018). A new sampling method to detect the Pyrenean desman (*Galemys pyrenaicus*). *Hystrix, the Italian Journal of Mammalogy*, 29(2), 190-194.
- MAGRAMA (2013). *Estrategia para la conservación del desmán ibérico (Galemys pyrenaicus) en España*. Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente, Madrid, 36 or.
- Nores, C. (2007). *Galemys pyrenaicus* (E. Geoffroy Saint-Hilaire, 1811), in: Palomo, L. J., Gisbert, J. eta Blanco, J. C. (arg.). *Atlas y libro rojo de los mamíferos terrestres de España*. Dirección General para la Biodiversidad – SECEM – SECEMU, Madrid. 96-98.
- (2012). Desmán ibérico – *Galemys pyrenaicus*, in: Salvador, A. eta Cassinello, J. (arg.). *Enciclopedia Virtual de los Vertebrados Españoles*. Museo Nacional de Ciencias Naturales, Madrid. <http://www.vertebradosibericos.org>. 20 or.
- Nores, C., Ojeda, F., Ruano, A., Villate, I., González-Esteban, J., Cano, J. M. eta García-Álvarez, H. E. (1992). *Aproximación a la metodología y estudio del área de distribución, estatus de población y selección de hábitat del desmán (Galemys pyrenaicus) en la Península Ibérica*. Ministerio de Medio Ambiente, Oviedo. 108 or.
- Richard, B. (1986). *Le desman des Pyrénées: un mammifère inconnu à découvrir*. Science et Découvertes, Ed. Le Rocher, Monaco. 119 or.
- Santamarina, J. (1995). Distribución de algunas especies de vertebrados terrestres en la cuenca del río Ulla (Galicia) en relación con la calidad de las aguas. *Ecología*, 9, 353-365.
- Zeale, M. R. K., Butlin, R. K., Barker, G. L. a, Lees, D. C. eta Jones, G. (2011). Taxon-specific PCR for DNA barcoding arthropod prey in bat faeces. *Molecular Ecology Resources*, 11, 236-44.

6. Eskerrak eta oharrak

Ikerketa hau LIFE IREKIBAI Proiektuak (LIFE 14 NAT/ES/00186), Donostiako Udaleko Ingurumen Zuzendaritza Sailak, Eusko Jaurlaritzako Ingurumen eta Lurralde Politika Sailak (156P/2016 Espediente), eta UPV/EHU Euskal Herriko Unibertsitateak finantziatua izan da. Eusko Jaurlaritzaren Doktoratu Aurreko Programak eta Euskal Herriko Unibertsitateak (UPV/EHU) finantzatu du AES. Amaitzeko, eskerrak eman nahi dizkiegu Aitor Arrizabalaga eta Aitor Larrañagari, datuak aztertzen laguntzeagatik, eta Vanessa Mata eta Hugo Rebelori Portugalgo CIBIO-InBIO ikerketa-zentroan egonaldia egiteko ateak ireki eta lana aurrera ateratzen laguntzeagatik. Eskerrak baita Artikutzako langileei eta Diputazioko guardei ere, mendiko lanak errazteagatik.

Saguzarren izurriekiko zaletasuna mahasti-sistema batean: kontrol biologikorako oinarritzko hastapenak

Baroja, Unai; Garin, Inazio; Aihartza, Joxerra; Vallejo, Nerea; Aldasoro, Miren eta Goiti, Urtzi

Zoologia eta Animalia Zelulen Biologia saila, Euskal Herriko Unibertsitatea UPV/EHU
ubaroja001gmail.com

Laburpena

Artropodo fitofagoek nekazal ekoizpenean kalte oso larriak eragiten dituzte urtero. Izurrien kontrako borrokan saguzarrak artropodoen jatun handienen taldean sailkatzen dira, hauetako hainbat izurri kontsumitzaile direlarik. Mahastiak nagusi diren nekazal sistema mediterraneoetan, kultibo ugari izurriek eragindako suntsipen masiboak jasaten dituzte; ondorioz ikerketa honetan DNA metabarcoding bidez saguzar espezie ezberdinen dieta eta izurriak kontsumitzeko gaitasuna denboran zehar aztertu dugu. Guztira, 72 izurri espezie detektatu ziren, hauetatik 30 izurri garrantzitsu kontsideratzen direlarik. Emaizten arabera, saguzar espezie ezberdinak baso eta nekazaritzako izurrien suntsitzaile handiak direla agerian geratzen da, hortaz populazio hauek faboratzeko dagozkion kontserbazio-neurriak hartzea premiazkoa da.

Hitz gakoak: DNA metabarcoding, izurri agroforestalak, izurri-kontsumoa, saguzarrak

Abstract

Herbivorous arthropods cause immense damage in crop production annually. Bats are considered amongst the most voracious predators of arthropods, of which some species are known to consume pests. In vineyard dominated Mediterranean agroecosystems, multiple crops are damaged caused by the attack of insect pests, thereby in this study, we aimed to explore the diet and pest consumption capacity of different bat species by means of DNA metabarcoding analysis of DNA extracted from faeces during the whole active period of most pest species. Overall, 72 pest species were identified and 30 of them are considered major pests. In view of the results, it can be asserted that the surveyed bat species may act as a suppressor of a wide array of agroforestry pests in Mediterranean agroecosystems. Therefore, appropriate conservation measurements to favour the growth of its populations should be considered.

Key words: Agroforestry pests, bats, DNA metabarcoding, pest consumption.

1. Sarrera

Azken hamarkadetan nekazaritzako pestizida kimikoen erabileraren kontrako araudi zorrotzak, izurriek hauekiko garatutako erresistentziak eta populazioak produkzio jasangarriarekiko egindako apustuak (Jensen et al., 2016), harrapakari naturalek izurrien kontrako borrokan duten garrantziaz ohartzera bultzatu gaituzte (Naranjo et al., 2015). Urtero, intsektu herbiboroek munduko nekazaritzako produkzioaren %10-26 galarazten dutela estimatzen da (Oerke, 2006). Gainera, aldaketa klimatikoak bultzatutako tenperaturaren igoerak izurriei mesede egingo die, kalteak are gehiago emendatuz (Deutsch et al., 2018).

Saguzarrak, beraien dieta-ohiturak direla eta, izurrien ehiztari nekaezinak dira (Russo et al., 2018), gau bakar batean beraien gorputz-masa bezainbeste intsektu jan dezaketelarik (Kunz et al., 1995). Eskualde epeletako udaberri-uda sasoian saguzarren energia-eskaria esanguratsuki areagotzen da, ondorioz ehizatasa emendatzen dutelarik (Kurta et al., 1989). Horrez gain, saguzarrek bizimodu anitzeko izurriei erantzun diezaiokete, intsektu hegalaria zein ez hegalarietatik, eguneko, gautar edota tamaina askotarikoetara. Berriki garatutako DNA metabarcoding bezalako teknika molekularrek saguzarren dieta espezie-mailaraino ezagutzea ahalbidetu digute (Aizpurua et al., 2018; Galan et al., 2018), saguzarrek izurrien dinamikan eduki dezaketen garrantzia agerian geratu delarik. Orain arte, zenbait ikerketek saguzarren dietan labore ezberdinetan kalteak eragiten dituzten izurriak detektatu dituzte (Aizpurua et al., 2018; Cleveland et al., 2006; McCracken et al., 2012; Puig-Montserrat et al., 2015); halere ikerketa hauetan ez ziren laginketa denboraldi luzeak egin eta laginak ez ziren aldizka bildu, puntualki baizik. Kontuan hartuta denboran saguzarrek beraien dieta zehar zeharo aldatu (McCracken

et al., 2012) eta izurriek izugarritzko gorabeherak eduki ditzaketela (Welch eta Harwood, 2014), saguzarren izurriak ustiatzeko gaitasuna denboran zehar aztertzea ezinbestekoa da.

Saguzarrak mahastietan ehizan hainbat alditan detektatu izan dira (Froidevaux et al., 2017; Kelly et al., 2016). Hauen artean, espezie ezberdinek ehiza-jokabide ezberdinak erakusten dituzte: batzuk airean hegatan dirauten artropodoak ehizatzen espezializatu dira, badira lurlean edo hostoetan atxikituta dauden harrapakinak harrapatzen gai direnak, zein beste hainbat ehiza-estrategia ezberdin erabil ditzaketenak ere (Jones eta Rayner, 1989); malgutasun trofiko honek harrapakin-espektro zabala ehizagarri izatea ahalbidetzen dielarik. Aurretik egindako ikerketen arabera, saguzar espezie asko lepidoptero edo sitsez elikatzen dira besteen artean (Bontadina et al., 2008); kontuan izanik nekazaritzako izurrien gehiengoa lepidopteroak direla, sistema intentsiboetan saguzar intsektiboroen dieta aztertzea guztiz beharrezkoa da, saguzarrek kontrolatzaile biologiko gisa bete dezaketen zerbitzu ekosistemikoak hobeto ulertu eta kudeaketa sostengarriago bati ateak zabaltzeko. Tamalez, mahastiez gailendutako sistema intentsibotan orain arte ez da saguzar-izurrien arteko elkarrekintza trofikorik ikertu eta beraz, saguzarrek nekazal sistema hauetan duten funtzioaz itsu-itsuan ibili gara.

2. Ikerketaren helburuak

Ikerketa honetan mahastiak gailentzen diren sistema mediterranearen batean dauden saguzar espezie ezberdinen dieta eta izurriak kontsumitzeko gaitasuna aztertu nahi izan dugu izurrien aktibitate handiko sasoiaren zehar.

3. Ikerketaren muina

3.1. Ikerketa eremua

2017ko maiatza-iraila bitartean Araba-Errioxa eskualdeko *Rhinolophus hipposideros*, *Pipistrellus pipistrellus*, *P. kuhlii*, *Hypsugo savii* eta *Myotis daubentonii* espezieen kolonietan gorotzak bi astero batu genituen. Paisaia batez ere mahastien laboreek osatzen dute, beste motatako kultiboen partzelek (olibadiak, arbendolondoak, zereal eta barazki-ortuak edota fruta-arbolak) ere bere garrantzia dutelarik. Horiez gain, *Populus nigra*, *P. alba*, *Alnus glutinosa*, *Fraxinus excelsior* edo *Sambucus sp.* ur-bazterreko basoak ere aurki daitezke; mediterraneoko eta *Quercus ilex* edo *Q. faginea* zuhaitzak eta *Q. coccifera* zuhaixkak; *Pinus nigra*, *P. pinaster*, *P. halepensis* eta *P. sylvestris* pinu-landaketak eta ibai, aintzira eta herrigune ezberdinek lurraldea egituratzen dute.

3.2. Gorotz-bilketa

Saguzar-kolonia bakoitzaren azpian gorotz-biltzaileak jarri eta bi astero laginak jaso genituen. Laginketa saio bakoitzaren ostean biltzaileak garbitu ziren. Gorotzak etiketatuak, 40° C-tan lehortuak eta -80°C-tan gorde ziren prozesatu bitartean. Kolonia eta aldi bakoitzerako, zoriz gutxienez 20 gorotz lagineko hautatu ziren eta ondoren homogeneizatu DNA nahastuz. Koloniaren tamainaren arabera, aldiro 1-3 azpilagin bildu ziren.

3.3. DNA erauzketa, liburutegi-prestaketa, sekuentziazioa eta prozesu bioinformatikoa

Gorotzetako DNA erauzketetarako DNeasy PowerSoil kit-a erabili genuen. Erauzketa-saio bakoitzean lagin zuriak edo kontrolak erabili ziren. Bi zitokromo oxidasa I (COI) markatzaile molekular edo "primer" osagarri erabili ziren, ahalik eta harrapakin-dibertsitate altuena detektatzeko (Esnaola et al., 2018). Ondoren, liburutegi-prestaketa burutu zen, hots laginak sekuentziazio masiborako prestatu ziren Illuminaren 16S Sekuentziazio Metagenomikoaren Liburutegi-Prestaketa protokoloa jarraituz (Amplicon, 2013). Azkenik, laginak Illumina MiSeq sekuentziadore batean sekuentziatu ziren.

Behin DNA sekuentzia gordinak edukita, iragazpen-prozesu bat aplikatu eta soilik kalitate onargarria zuten sekuentziak mantendu ziren, horretako USEARCH v.10 eta Cutadapt software-ak erabili zirelarik (Edgar, 2010; Martin, 2011). Lagin zurietan agertzen ziren sekuentziak gainerako laginetatik ezabatu ziren kontaminazio-arrastoak ekiditeko eta gero haplotipoetan taldekatu. Ondoren, haplotipoak ZOTU-etan (Edgar, 2016) bildu eta sareko BOLD systems (www.boldsystems.org) erreferentzia datu-baseekin erkatu genituen dagozkion harrapakin-espezieen identifikazioak burutzeko.

3.4. Izurrite-inpaktua zehaztea

Dieta aztertu ostean, izurrite kontsideratutako espezieak nekazaritzan duten inpaktu eta garrantzi ekonomikoaren arabera sailkatu ziren Alford (1999 eta 2016), Hill (2008) eta Lakatos et al. (2014)-en oinarrituta: a) izurri xumeak: produkzioan kalte ekonomiko larriarik eragiten ez dituztenak eta b) izurri garrantzitsuak: kalte ekonomiko larriak eragiten dituztenak.

3.5. Datuen analisia

Ikerketa hau baldintza espazio-tenporal ezberdinetan eman zen. Hori horrela, elkarrekintza espazio-tenporalak, espazialak (koloniak) eta tenporalak (bi asteko aldiak) izurri espezie ezberdinen agerpenean duten efektuak testatzeko bi bideko bariantzaren analisia (ANOVA bi-faktoriala) burutu genuen (Legendre et al., 2010) *STImodels* funtzioa (Legendre et al., 2012) R-n (R Team, 2018) erabiliz. Analisi hau ferra-saguzar txikiaren (*R. hipposideros*) kasurako soilik burutu zen, laginak laginketa-denboraldi osoan zehar lortu ziren espezie bakarra izan zelako. Gainerako espezieetan, ezin izan zen laginketa-saio bakoitzean gorotz nahiko lortu.

3.6. Emaizak

Saguzar espezie ezberdinen dietan identifikatutako artropodoetatik, 30 izurri larri eta 42 izurri xume kontsumitu zituzten (1 Taula). Hauetatik gehiena (n=57) lepidopteroei dagozkie, zazpi hemipteroei (zimitzak), bost espezie dipteroei, eta hiru koleopteroei (kakalardoak). Saguzarren artean, *R. hipposideros*-ek ustiatu zituen izurri gehien, dietan 24 izurri larri eta 31 izurri xume identifikatuta.

1. taula. Saguzar espezie ezberdinen gorotzetan identifikatutako izurri espezieak, kaltetutako kultiboak, haien izurrite-egoera eta kontsumitu duen saguzar espezieak. (*) Izurri xumea, (**) izurri garrantzitsua; (1) *R. hipposideros*, (2) *P. pipistrellus*, (3) *P. kuhlii*, (4) *H. savii*, (5) *M. daubentonii*.

Ordena	Izurria	Kaltetutako kultiboak	Izurrite mota	Saguzarra
Lepidoptera	<i>Acleris schalleriana</i>	Akamailua, landare apaingarriak	*	1
	<i>Acleris variegana</i>	Sagarrondoa, madariondoa, gereziondoa...	**	1
	<i>Agrotis obesa</i>	Polifagoa	*	2,3
	<i>Aleimma loeflingiana</i>	Haritza, xarma, astigarra	*	1
	<i>Anacamptis populella</i>	Makala, sahatsa	*	1
	<i>Ancylis achatana</i>	Fruta-arbolak (sagarrondoa, aranondoa...)	*	1
	<i>Archips podana</i>	Polifagoa (madariondoa, muxurka arbola)	**	1
	<i>Archips rosana</i>	Sagarrondoa, aranondoa, mugurdia	*	1
	<i>Argyresthia abdominalis</i>	Haritza	*	1
	<i>Argyresthia sorbiella</i>	Gurbea (<i>Sorbus aucuparia</i>)	*	1
	<i>Argyresthia spinosella</i>	Aranondoa	*	1
	<i>Autographa gamma</i>	Barazkiak, landare apaingarriak	**	2
	<i>Bedellia somnulentella</i>	Konbulbalazeoen familia	*	1,3
	<i>Calliteara pudibunda</i>	Lupuloa, fruta-arbolak	*	1
	<i>Cameraria ohridella</i>	Indi gaztaina	**	2,3
	<i>Clepsis consimilana</i>	Zuhaitz eta zuhaixka ugari (Rosaceae familia)	*	1
	<i>Cnephasia incertana</i>	Polifagoa (marrubia, mahastia, sagarrondoa...)	*	1
	<i>Cosmia trapezina</i>	Polifagoa, fruta-arbolak	*	2
	<i>Cydia fagiglandana</i>	Pagoa, haritza	*	1,3
	<i>Cydia pomonella</i>	Sagarrondoa, madariondoa, irasagarra...	**	1
	<i>Cydia splendana</i>	Intxaurra, gaztainondoa	*	1
	<i>Ditula angustiorana</i>	Polifagoa, fruta-arbolak	*	1
	<i>Ephestia parasitella</i>	Polifagoa (mahastia)	**	1,2,3
	<i>Exoteleia dodecella</i>	Pinua	**	1
	<i>Galleria melonella</i>	Erlezaintza	**	2
	<i>Gymnoscelis rufifasciata</i>	Limoia, olibadiak	*	5
	<i>Gypsonoma aceriana</i>	Makala	**	1,5
	<i>Hedya nubiferana</i>	Sagarrondoa, madariondoa, arbendola...	*	1
	<i>Hedya ochroleucana</i>	Rosazeoak (sagarrondoa...)	*	1
	<i>Hedya pruniana</i>	Rosazeoak (aranondoa, gereziondoa...)	*	1
	<i>Lobesia botrana</i>	Mahastia	**	1,2,3
	<i>Mythimna unipuncta</i>	Zereal-landaketak	**	1,2

	<i>Neosphaleroptera nubilana</i>	Aranondoa, sagarrondoa, abrikota	*	1
	<i>Notocelia uddmanniana</i>	Masusta	**	1
	<i>Oecophora bractella</i>	Mahaspasa, masusta	*	1
	<i>Orthotaenia undulana</i>	Haltza, zumarra, urkia, astigarra...	*	1
	<i>Parornix devoniella</i>	Hurra	*	1
	<i>Peribatodes rhomboidaria</i>	Mahastia, fruta-arbolak	*	2
	<i>Peridroma saucia</i>	Polifagoa (zuhaitzak, kultiboak)	**	1,2
	<i>Phthorimaea operculella</i>	Solanazeoak (patata)	**	1
	<i>Phyllonorycter blancardella</i>	Sagarrondoa	*	2
	<i>Phyllonorycter messaniella</i>	Zuhaitzak, fruta-arbolak	*	1,2
	<i>Plodia interpunctella</i>	Biltegitratze janaria	**	3
	<i>Plutella xylostella</i>	Kultibo brasikazeoak (barazkiak)	**	1,2
	<i>Prays oleae</i>	Olibadia	**	1
	<i>Recurvaria leucatella</i>	Sagarrondoa, madariondoa	*	1
	<i>Recurvaria nanella</i>	Fruta-arbolak (sagarrondoa, arbendola...)	**	1,2
	<i>Rhyacionia buoliana</i>	Pinua	**	1,2,3
	<i>Rhyacionia pinicolana</i>	Pinua	*	1
	<i>Sparganothis pilleriana</i>	Mahastia	**	1,2,3
	<i>Spilonota ocellana</i>	Sagarrondoa, madariondoa, irasagarra	*	1
	<i>Spodoptera exigua</i>	Polifagoa (mahastia, tomate, piperra...)	**	1
	<i>Stigmella floslactella</i>	Hurra, xarma	*	2
	<i>Thaumetopoea pityocampa</i>	Pinua	**	1,2
	<i>Tischeria ekebladella</i>	Gaztainondoa	*	1
	<i>Udea ferrugalis</i>	Aranondoa, andere-mahatsa, alkatxofa	*	1
	<i>Ypsolopha scabrella</i>	Sagarrondoa, gereziondoa, aranondoa	*	1
Hemiptera	<i>Adelphocoris lineolatus</i>	Alpapa, babarrunak, kotoia, mertxikondoa...	**	1
	<i>Aelia acuminata</i>	Zerealak	**	4
	<i>Fieberiella florii</i>	Rosazeoak, gaixotasun fitoplasmatikoen bektore	**	1
	<i>Liorhyssus hyalinus</i>	Polifagoa (kotoia, tabakoa, zerealak...)	*	3
	<i>Nezara viridula</i>	Tomatea, piperra, soja, mahastiak, fruta-arbolak	**	2,3,4
	<i>Nysius cymoides</i>	Polifagoa	*	2,3,4,5
	<i>Philaenus spumarius</i>	<i>Xylella fastidiosa</i> -ren bektore	*	1,2,3,4
Diptera	<i>Coboldia fuscipes</i>	Belarri landua perretxikoa (<i>Pleurotus ostreatus</i>)	**	5
	<i>Delia platura</i>	Zerealak, babarrunak, tomate, ilarra...	**	1,2
	<i>Drosophila suzukii</i>	Polifagoa, frutak (mahastia, pikondoa...)	**	1,2,3
	<i>Tipula oleracea</i>	Barazkiak, marrubia...	*	1,2,3
	<i>Tipula paludosa</i>	Barazkiak, zerealak	**	1
Coleoptera	<i>Curculio elephas</i>	Gaztainondoa	**	2,3
	<i>Curculio glandium</i>	Haritza	**	1,2,4
	<i>Tenebrio molitor</i>	Biltegitratze janaria (hirina, ogia...)	*	3

Denborak dietako izurri espezie ezberdinen agerpenean efektu esangarria zuen ($F = 1,839$; $R^2 = 0,458$; $p = <0,001$). Espazioaren ($F = 0,798$; $R^2 = 0,044$; $p = 0,83$) eta elkarrekintza espazio-tenporalaren ($F = 0,994$; $R^2 = 0,137$; $p = 0,49$) efektu esangarririk ordea, ez zen behatu.

3.7. Eztabaida

Saguzar espezie ezberdinek kontsumitutako 72 izurri espezieen artean mota askotako kultibo eta landaketetan kalteak eragiten dituzten intsektuak aurki daitezke; besteak beste mahastiak (e.g. *Lobesia botrana*, *Sparganothis pilleriana*, *Drosophila suzukii*), fruta-arbolak (e.g. *Acleris variegana*, *Cydia pomonella*), olibadiak (e.g., *Prays oleae*, *Gymnoscelis rufifasciata*), zereal-landaketak (e.g., *Tipula paludosa*, *Mythimna unipuncta*), barazkiak (e.g., *Spodoptera exigua*, *Autographa gamma*), baso-landaketak (e.g., *Thaumetopoea pityocampa*, *Rhyacionia buoliana*), perretxikoen hazkuntza (e.g. *Coboldia fuscipes*) edota erle-hazkuntza (e.g. *Galleria melonella*) kaltetzen dituztenak.

Orain arte, zenbait dieta-analisietan, izurri gutxi batzuetatik (Galan et al., 2018) kopuru anitzetara (Aizpurua et al., 2018), izurrien DNA aurkitu izan den arren, ikerketa orotan laginketak ez ziren

denboraldi luzeetan zehar burutu. Gure emaitzek aditzera ematen dute izurri espezie ezberdinen agerpena dietan denboran zehar aldatzen dela, hortaz eremu zehatz bateko saguzarrek izurriak kontsumitzeko duten gaitasuna neurtzeko laginketak denboraldi luzeetan zehar burutzea ezinbestekoa da. Guk kultiboen aldi begetatibo eta izurri gehienen heldu-fase osoan zehar lagindu genuen, ferra-saguzar txikiaren ehiza-gaitasuna modu adierazgarrian aztertuz. Gainerako espezieen kasuan, ezin izan genuen lagin-kopuru nahikoa bildu laginketa saio guztietan eta hortaz, kontsumitzen dituzten izurrien lista guk bildutakoa baino luzeagoa izan daitekelakoan gaude.

Azkenik, ikerketa honek DNA metabarcoding-ak dieta-azterketen bidez harrapakari-izurrien elkarrekintzak ezagutzeko duen balioa berresten du eta izurri berrien detekzio goiztiarra bermatu ere (Maslo et al., 2017).

4. Ondorioak

Lehenengo aldiz, ikerketa honetan *R. hipposideros*-en espezie-mailako agroekosistema intentsibo bateko udaberri-udako dieta eta izurrien kontsumo gaitasuna jakinarazi dugu, baita, partzialki bada ere, *P. pipistrellus*, *P. kuhlii*, *H. savii* eta *M. daubentonii*-ren izurriak kontsumitzeko gaitasuna ere; saguzar hauen eta izurrien arteko elkarrekintza trofikoaren funtsezko hastapenak ezarri, eta animalia hauek eskaintzen dituzten zerbitzu ekosistemikoen berri emanez. Bigarrenez, saguzar espezie hauek baso eta nekazaritza produkzioan ekar ditzaketen onura sozio-ekonomikoak aintzat hartuta, saguzarren populazioak faboratzeko dagozkion kontserbazio-neurriak hartzea premiazkoa da. Horrez gain, dauden gordelekuen babesak eta berrien eraikuntzak (Alcalde et al., 2017) hil edo biziko garrantzia eduki dezake datozen urteotan.

5. Etorkizunerako planteatutako norabidea

Etorkizunari begira, saguzar eta izurrien arteko elkarrekintzak hobeto ezagutzeko ikerketa sakonagoak egitea ezinbestekoa da, saguzar espezie gehiagoren dieta barneratuz eta dieten emaitzak saguzarren denboran zeharreko aktibitate eta izurrien gorabeherekiko erkatuz.

6. Erreferentziak

Aizpurua, O., Budinski, I., Georgiakakis, P., Gopalakrishnan, S., Ibañez, C., Mata, V., ... & Zmrcic, V. (2018). Agriculture shapes the trophic niche of a bat preying on multiple pest arthropods across Europe: Evidence from DNA metabarcoding. *Molecular Ecology*, 27(3), 815-825.76.

Alcalde, J. T., Martínez, I., Zaldua, A., & Antón, I. (2017). Conservación de colonias reproductoras de murciélagos cavernícolas mediante refugios artificiales. *Barbastella*.

Alford, D. V. (1999). *A textbook of agricultural entomology*. Blackwell Science Ltd. Oxford, UK.

Alford, D. V. (2012). *Pests of ornamental trees, shrubs and flowers: A colour handbook*. CRC Press. Academic Press, New York, NY, USA.

Alford, D. V. (2016). *Pests of fruit crops: a colour handbook*. CRC press (Eds.). Manson Publishing, London, U.K.

Amplicon, P. C. R., Clean-Up, P. C. R., & Index, P. C. R. (2013). *16S Metagenomic Sequencing Library Preparation*.

Bontadina, F., Schmied, S. F., Beck, A., & Arlettaz, R. (2008). Changes in prey abundance unlikely to explain the demography of a critically endangered Central European bat. *Journal of Applied Ecology*, 45(2), 641-648.

Cleveland, C. J., Betke, M., Federico, P., Frank, J. D., Hallam, T. G., Horn, J., ... & Sansone, C. G. (2006). Economic value of the pest control service provided by Brazilian free-tailed bats in south-central Texas. *Frontiers in Ecology and the Environment*, 4(5), 238-243.

Deutsch, C. A., Tewksbury, J. J., Tigchelaar, M., Battisti, D. S., Merrill, S. C., Huey, R. B., & Naylor, R. L. (2018). Increase in crop losses to insect pests in a warming climate. *Science*, 361(6405), 916-919.

- Edgar, R. C. (2010). Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics*, 26(19), 2460-2461.
- Edgar, R. C. (2016). UNOISE2: improved error-correction for Illumina 16S and ITS amplicon sequencing. *BioRxiv*, 081257.
- Esnaola, A., Arrizabalaga-Escudero, A., González-Esteban, J., Eloisegi, A., & Aihartza, J. (2018). Determining diet from faeces: Selection of metabarcoding primers for the insectivore Pyrenean desman (*Galemys pyrenaicus*). *PloS One*, 13(12), e0208986.
- Froidevaux, J. S., Louboutin, B., & Jones, G. (2017). Does organic farming enhance biodiversity in Mediterranean vineyards? A case study with bats and arachnids. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 249, 112-122.
- Galan, M., Pons, J. B., Tournayre, O., Pierre, E., Leuchtmann, M., Pontier, D., & Charbonnel, N. (2018). Metabarcoding for the parallel identification of several hundred predators and their prey: Application to bat species diet analysis. *Molecular Ecology Resources*, 18(3), 474-489.
- Hill, D. S. (2008). Major tropical crop pests. In *Pests of crops in warmer climates and their control* (pp. 115-497). Dordrecht, The Netherlands, Springer Science & Business Media.
- Jensen, D. F., Karlsson, M., Sarrocco, S., & Vannacci, G. (2016). Biological control using microorganisms as an alternative to disease resistance. *Plant Pathogen Resistance Biotechnology*, 341-363.
- Jones, G., & Rayner, J. M. (1989). Foraging behavior and echolocation of wild horseshoe bats *Rhinolophus ferrumequinum* and *R. hipposideros* (Chiroptera, Rhinolophidae). *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 25(3), 183-191.
- Kelly, R. M., Kitzes, J., Wilson, H., & Merenlender, A. (2016). Habitat diversity promotes bat activity in a vineyard landscape. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 223, 175-181.
- Kunz, T. H., Whitaker, J. O., & Wadanoli, M. D. (1995). Dietary energetics of the insectivorous Mexican free-tailed bat (*Tadarida brasiliensis*) during pregnancy and lactation. *Oecologia*, 101(4), 407-415.
- Kurta, A., Bell, G. P., Nagy, K. A., & Kunz, T. H. (1989). Energetics of pregnancy and lactation in freeranging little brown bats (*Myotis lucifugus*). *Physiological Zoology*, 62(3), 804-818.
- Lakatos, F., Mirtchev, S., & Mehemeti, A. (2014). Hand Book of Major Forest Pests in Southeast Europe. *Food and Agriculture Organization of the United Nations, Pristina*, 71-100.
- Legendre, P., Cáceres, M. D., & Borcard, D. (2010). Community surveys through space and time: testing the space-time interaction in the absence of replication. *Ecology*, 91(1), 262-272.
- Legendre, P., Cáceres, M.D., & Borcard D. (2012). STI:Space-time ANOVA models without replications; R package version 3.1.1.
- Martin, M. (2011). Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet. Journal*, 17(1), pp-10.
- Maslo, B., Valentin, R., Leu, K., Kerwin, K., Hamilton, G. C., Bevan, A., ... & Fonseca, D. M. (2017). Chirosurveillance: The use of native bats to detect invasive agricultural pests. *PloS One*, 12(3), e0173321.
- McCracken, G. F., Westbrook, J. K., Brown, V. A., Eldridge, M., Federico, P., & Kunz, T. H. (2012). Bats track and exploit changes in insect pest populations. *PloS One*, 7(8), e43839.
- Naranjo, S. E., Ellsworth, P. C., & Frisvold, G. B. (2015). Economic value of biological control in integrated pest management of managed plant systems. *Annual Review of Entomology*, 60.
- Oerke, E. C. (2006). Crop losses to pests. *The Journal of Agricultural Science*, 144(1), 31-43.

Puig-Montserrat, X., Torre, I., López-Baucells, A., Guerrieri, E., Monti, M. M., Ràfols-García, R., ... & Flaquer, C. (2015). Pest control service provided by bats in Mediterranean rice paddies: linking agroecosystems structure to ecological functions. *Mammalian Biology-Zeitschrift für Säugetierkunde*, 80(3), 237-245.

Team, R. C. (2018). R: A language and environment for statistical computing.

Russo, D., Bosso, L., & Ancillotto, L. (2018). Novel perspectives on bat insectivory highlight the value of this ecosystem service in farmland: research frontiers and management implications. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 266, 31-38.

Welch, K. D., & Harwood, J. D. (2014). Temporal dynamics of natural enemy–pest interactions in a changing environment. *Biological Control*, 75, 18-27.

7. Eskerrak eta oharrak

Eskerronak eman nahi genizkioke ardo-bodegetako jabeei saguzar gorotzen bilketa errazteagatik, Itxaso Larrinagari laginketetan laguntzeagatik, Gonzalo García-Baquerori estatistikako analisietan laguntzeagatik eta Genomika Zerbitzuari: Sekuentziazio eta Genotipatze Unitatea-SGIker (UPV/EHU/ERDF, EU) bere laguntza teknikoagatik.

Ikerketa hau Ekonomia eta Lehiakortasun Ministeritza eta Lurralde Garapenerako Funts Europarrak (CGL-2015-69069P kodea), zein Eusko Jaurlaritzak (IT754-13) diruz lagundu dituzte. Eusko Jaurlaritzak UB-ri doktoretza aurreko beka eman zion (PRE_2016_1_0139).

Alkoxisilanoz eraldatutako emultsio kopolimeroen bilakaera biltegitratzean zehar

Barquero, Aitor; Agirre, Amaia; Leiza, Jose Ramon eta Barandiaran, María Jesús

*POLYMAT, Kimika Aplikatua Saila, Kimika Fakultatea, Euskal Herriko Unibertsitatea
UPV/EHU, Joxe Mari Korta Zentroa*

aitor.barquero@ehu.eus

Laburpena

Lan honetan poli(binil azetatoa) oinarri daukan eta binil trialkoxisilano monomero desberdinekin eraldatutako emultsio polimerizazioz lortutako latexa aztertzen da, estaldura aplikazioetan erabiltzeko asmoz. Hainbat teknika erabiliz (zentrifugazioa, soxhlet erauzketa, AF4/MALS...) ikusi da silano monomeroak formulazioan kopuru txikietan gehitzean polimeroak biltegitratzean zehar aldatu egiten direla, silanoen kondentsazio erreazioen kausaz. Ez hori bakarrik, erabilitako silanoak bilakaeraren abiadura eragina daukala ere ikusi da, zehazki, are eta hidrolisi abiadura azkarragoa izan, orduan eta bilakaera azkarragoa dauka kopolimeroak.

Hitz gakoak: Emultsio polimerizazioa, alkoxisilano monomeroa, poli(binil azetatoa), estaldurak

Abstract

In this work poly(vinyl acetate) based copolymers, modified with vinyl alkoxysilane monomers are studied, for coating applications. Using different techniques (centrifugation, soxhlet extraction, AF4/MALS...) it was observed that when the alkoxysilane is added in small amounts to the formulation the copolymers gain the ability to change during the storage, due to the condensation reactions of the silanes. Not only that, the rate of evolution is greatly affected by the silane type, and can be correlated with the hydrolysis rate of the alkoxy group.

Keywords: Emulsion polymerization, alkoxysilane monomer, poly(vinyl acetate), coatings

1. Sarrera eta motibazioa

Polimeroen aplikazioen artean, estaldurek (pinturek eta bernizek) garrantzi handia daukate industrian. Haien funtzioa ez da bakarrik apaingarria, izan ere, behar beharrezkoak dira gainazalen babeserako. Adibidez, metalezko gainazalen kasuan, herdoiltzearen aurkako estaldurek eraikuntzen bizitza luzatzen laguntzen dute.

Tradizionalki disolbatzaileetan oinarritutako estaldurak ekoiztu izan dira industrian, baina azkenengo hamarkadetan uretan oinarritutako estalduretara aldatzen ari da merkatua. Uretako pinturak orokorrean aukera berdeagoa eta seguruagoa dira, ez baitute konposatu organiko hegazkorrik (disolbatzailerik) askatzen atmosferara. Hauek, usai txarra izateaz gain, toxikoak dira ingurumenarekiko eta berotegi-efektua areagotzen laguntzen dute.

Uretan oinarritutako estaldurak produktu oso konplexuak dira; osagai nagusiak, latexa, pigmentuak eta gehigarriak izanik. Latexa emultsio polimerizazioz sintetizatzen den produktua da, eta eskala nanometrikoa daukaten, eta uretan barreiatuta dauden polimero partikulek osatzen dute. Latexak amaierako produktuan izugarritzko eragina dauka, besteak beste pinturaren propietate mekanikoak eta barrera gaitasunak definituko baititu. Uretako pinturen desabantaila film eraketa prozesuan dago. Lehortze prozesuan, ura lurruntzen den heinean polimero partikula desberdinetan dauden polimero kateak elkarren artean katramilatu behar dira, film jarraitua sortuz. Tamalez, partikulen arteko koaleszentzia ez da beti perfektua, eta sortutako akatsek filmaren propietateak kaltetzen ditu. Hori dela eta, uretan oinarritutako estaldurek ez dituzte beti disolbatzaileetan oinarritutakoek dauzkaten propietateak eta eskakizun handiko aplikazioetarako, automobilgintzaren industriarako adibidez, uretan oinarritutako estaldurek ez dute oraindik

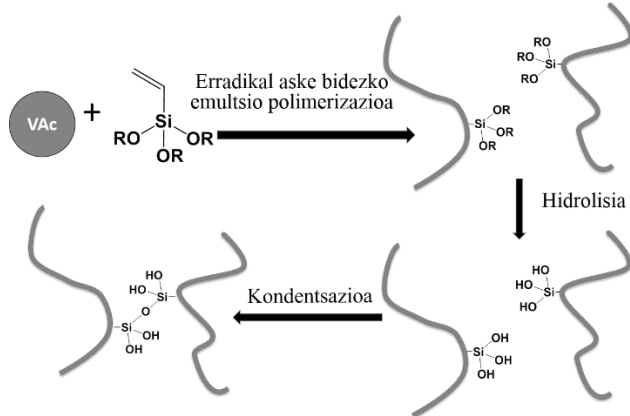
merkatuan lekurik egin. Hortaz, estalduren merkatuaren etorkizuna uretan oinarritutako pinturetan egongo bada, latexaren propietateak hobetu behar dira disolbatzaileetatik lortutako pinturek dauzkaten prestakuntzak izan ditzaten.

Latexaren propietateak hobetzeko dauden aukeren artean polimeroa saretzea dago. Saretzeak estalduraren disolbatzaileekiko, urarekiko eta urradurarekiko erresistentzia hobetzen du. Polimeroak sartzeko kimika aspalditik da ezaguna, baina ez da erreza estaldurak egiteko erabiliko den dispersioetan aplikatzea. Izan ere, latexaren partikulak saretuta baldin badaude, film eraketan zehar kateen mugikortasuna oso mugatua egongo da eta kohesio txikiko filmak lortuko dira. Hau dela eta, saretzea filmaren lehorte prozesua ematen den aldi gertatzea da komenigarriena.

Literaturan aztertu diren sistemen artean (hidrazinak, azetoazetoxi monomeroak etab...) binil trialkoxisilanoak aukera interesgarria izan daitezke. Binil trialkoxisilanoak silanoen alkoxi deribatuak dira, $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{Si}(\text{OR}')_3$ formula orokorra dutenak.

Alkoxisilanoek urarekin erreakzionatzen dute, silanol taldeak sortuz, ondoren beraien artean kondentsatu dezaketenak. Silanoak polimero kate desberdinetan baldin badaude, hidrolisiaren ondoren kondentsazioak kateak saretuko ditu, 1. irudian erakusten den moduan. Kasu idealean, hidrolisia polimerizazio prozesuan edo biltegitratzean zehar gertatu beharko litzateke, eta kondentsazioa filmaren eraketan.

1. irudia. Polimeroak alkoxisilanoak erabiliz sartzeko erreakzioen eskema



Lan honetan bi binil alkoxisilano erabili dira, binil trimetoxisilanoa (VTMS) eta binil trietoxisilanoa (VTES). Hauen artean dagoen desberdintasuna alkoxi taldea da. Hau garrantzitsua izango da ikerketa honetan alkoxi taldeak monomeroaren hidrolisian eragina izango duelako, eta hortaz VTMSa azkarrago hidrolizatuko da VTESa baino (Wituki, 1993; Osterholtz eta Pohl, 1992). Horrez gain, guztiz hidrolizatua dagoen binil silanotriola (VSTO) ere erabiliko da erreferentzia moduan eta erreakzio mekanismoak hobeto ulertzeko.

2. Arloko egoera eta ikerketaren helburuak

Alkoxisilanoen erabilera emulsio polimerizazioz egindako dispersioetan ezaguna da jada. Argitaratutako lanetan, silano kopuru txikiak gehitzean filmaren erresistentzia hobetzen dela diote, bai argi ultramorearekiko, urarekiko, disolbatzaileekiko, tenperaturarekiko zein urradurarekiko. Ez hori bakarrik, metalezko substratuekiko adhesioa ere hobetzen dute (Abd El-Ghaffar et al., 2016; Naghash et al., 2005; Zhang et al., 2008; Dubininkas eta Buika, 2013).

Alabaina, ez da dena positiboa. Silanoen erabilerak polimeroari gaitasun gehigarri (eta agian ez desiragarri) bat ematen dio. Izan ere, hidrolisi eta kondentsazio erreakzioak giro tenperaturan gertatu daitezke ingurumenean ura dagoenean, eta hori dela eta, polimeroa saretuz joan daiteke dispersioa biltegitratuta dagoenean. Bilakaera honek polimeroaren mikroegitura aldatuko du (gel edukia, pisu molekularren banaketa...) eta ondorioz filmaren propietateak ere aldatuz joango dira.

Guk dakigula, ez dago argitalpenik portaera hau deskribatzen duenik eta hortaz hau aztertzea da lan honen helburua.

3. Ikerketaren muina

3.1. Atal esperimentalak

Lan honetan emulsio polimerizazioz sintetizatutako hiru latexen bilakaeraren jarraipena egin da. Horretarako, sintesia egin ondoren aurrerago azaltzen diren teknikak erabiliz latexa karakterizatu zen astean behin hainbat astetan zehar, eta lortutako emaitzak nola aldatu ziren ikusi zen.

Materialak

Binil azetatoa (VAc, Quimidroga), alkil difenil oxido disulfonatoa (Dowfax 2A1, Dow chemicals), potasio persulfatoa (KPS, Fluka), azido kloridrikoa (HCl, Panreac), sodio hidroxidoa (NaOH, Sigma-Aldrich), potasio fosfato monobasikoa (KH_2PO_4 , Fluka), eta hidrokinona (HQ, Paneac) jaso ziren moduan erabili ziren. Ur desionizatua erabili zen erreakzio guztientzat. Binil trimetoxisilanoa (VTMS) eta binil trietoxisilanoa (VTES), Waker Chemiek adeitasunez hornitu zituen. Binil silanotriola (VSTO), erreakzioa burutu aurretik sortu zen VTMSa pH azidotan zegoen ur disoluzio batekin hidrolizatuz.

Sintesia

Kopolimeroen sintesia emulsio polimerizazioz egin zen, modu ez-jarraituan 400 ml-ko altzairuzko errektore batean. Formulazio osoa (hasarazlea izan ezik) errektorean kargatu eta erreakzio tenperaturara (67°C) eraman ondoren, hasarazlearen ur disoluzio bat injeztatu zen eta 2 orduz utzi zen erreakzionatzen. Erreakzioa amaitu ondoren, 25°C -tara hoztu eta hidrokinona disoluzio tanta batzuk gehitu ziren, erradikalen sorrera ekiditeko. 1. taulan erabilitako formulazioa erakusten da.

1. taula. Emulsio polimerizazioak egiteko erabilitako formulazioa

Osagaia	Kantitatea (g)
Binil azetatoa	90
Silano monomeroa	Aldakorra ¹
Potasio persulfatoa	0,135
Dowfax 2A1	2,00
pH 6 ur tanpoi disoluzioa	210 ²

Karakterizazioa

Gel edukia tetrahidrofuranotan (THF) disolbagarria ez den polimero frakzio bezala definitu da. Latexaren lehorte prozesuak saretze erreakzioak ematen dituzenez, bi gel eduki bereizten ditugu:

Gel eduki hezea: Latexean lehorte aurretik dagoen polimero saretuaren frakzioa. Honen determinaziorako latexaren kantitate jakin bat aurrez pisatutako tetrahidrofuranotan disolbatu zen, eta 48 orduz nahasten utzi zen. Ondoren, 12.000 rpm-tan 22 orduz zentrifugatuz disolbatutako zatia eta disolbatu gabekoa banandu ziren eta gel edukia grabimetriaz determinatu zen.

¹ 0,90 g VTMS edo 1,15 g VTES

² VSTOarekin egindako erreakzioan 10 g pH 2 (VTMSa hidrolizatzeko) eta 200 g pH 6 tanpoi erabili ziren

Gel eduki lehorra: Latexa lehortu ondoren lortzen den filmaren gel edukia soxhlet erauzketa bidez determinatu zen. Latex tantak beira zuntzeko oinarrian zuzenean lehortu ondoren 24 orduko soxhlet erauzketa egin eta frakzio disolbaezina grabimetriaz determinatu zen.

Fluxu asimetrikoko fluxu eremuko zatikapena (*Asymmetric flow field flow fractionation, AF4*) angelu anitzeko argi dispersio detektorearekin (*multi angle light scattering, MALS*) erabiliz polimeroen pisu molekularra (M_w) eta biraketa erradioa (R_z) neurtu ziren. Lagina prestatzeko latexa zuzenean THFtan disolbatu zen lehortu gabe mikroegitura mantentzeko $10\text{mg}_{\text{polimero}}/\text{g}_{\text{THF}}$ kontzentrazioan. Lortutako balioak putze gaitasuna kalkulatzeko erabili ziren, (1) ekuazioaren bitartez, non M_w batez besteko pisu molekularra (g/mol), R_z batez besteko biraketa erradioa (nm), N_A Avogadroren zenbakia ($6,022 \cdot 10^{23}$) eta ρ_p polimeroren dentsitatea ($1,19\text{g/cm}^3$) diren.

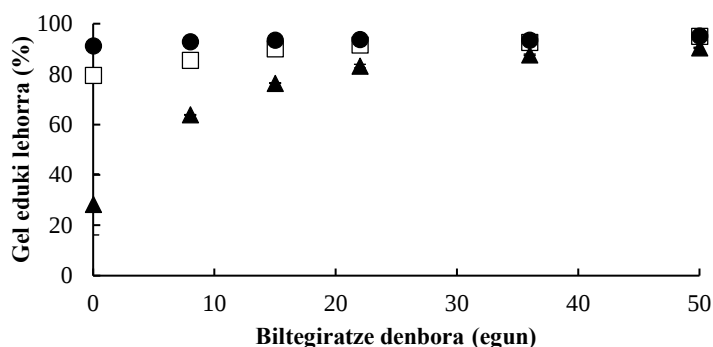
$$\text{Putze erlazioa} = \frac{\text{Putzutako kateen bolumena}}{\text{Putzu gabeko kateen bolumena}} = \frac{4\pi R_z^3 N_A \rho_p}{3 M_w} 10^{-21} \quad (1)$$

Silanoen hidrolisia askatutako alkoholen kontzentrazioa neurtuz aztertu zen. Hau gas kromatografia bitartez egin zen GC-14A (Shimadzu) kromatografo batean, sugar ionizazioko detektagailu, eta integradore (Shimadzu C.R6A Chromatopac) batekin. Erabilitako zutabea BP624 (SGE analytical science) zen, 50 m-ko luzera, 0,53 mm-ko barne diametroa eta $3,0 \mu\text{m}$ -ko mintz lodiera daukana.

3.2. Emaitzak eta ondorioak

2. irudian gel eduki lehorren bilakaera aurkezten da, soxhlet erauzketaz neurtuta, erabilitako hiru sistemetan biltegitratze denboraren aurrean.

2. irudia. Gel lehorren bilakaera VAc-VTMS ($\square$), VAc-VTES ($\blacktriangle$) eta VAc-VSTO ($\bullet$) kopolimeroentzat



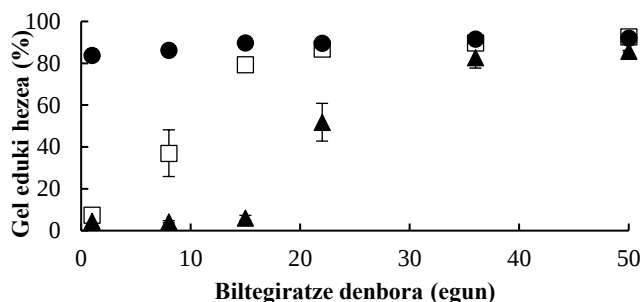
Erreakzioa amaitu osteko gel edukiek (biltegitratze denbora 0 denean) jada erakusten dute silano desberdinek emaitza desberdina ematen dutela. Emaitzak erraz azaldu daitezke silano bakoitzaren hidrolisi abiadura kontuan hartuta, izan ere, orduan eta hidrolisi maila altuagoa, orduan eta silanol talde gehiago egongo batira lehortzean kondentsatzeko eta polimeroa saretzeko. VSTOak, hasieratik hidrolizatuta dagoena gel eduki oso altuak ematen ditu. VTMSa, erreakzioan zehar azkar hidrolizatzen dena, gel eduki altua dauka ere, baina ez VSTOa bezain bestekoa. Azkenik, VTESA, erreakzioan motel hidrolizatzen dena (eta ondoren ikusiko den moduan biltegitratzearen hasieran guztiz hidrolizatua ez dagoena, ikus 4. irudia), balio baxuagoak ematen ditu.

Biltegitratze denborak aurrera egiten duen heinean, VTMS eta VTESA daukaten latexen gel edukia gora egiten du, VSTOa daukana konstante mantentzen den bitartean. Bilakaera izateko tarteak daukatenez, VTMSa eta VTESA daukaten latexak hidrolizatuz eta saretuz doaz dispersioan, eta horregatik gel edukia gora egiten du. Hala eta guztiz ere, honek ez du esan nahi VSTOa

daukan latexa ez dela bilakatzen ari, baizik eta gel edukiak ez daukala beharrezko sentikortasuna gertatu daitezken aldagetak determinatzeko.

Atal honetan neurtutako gel edukia film lehorren propietateak ulertzeko da beharrezkoa, aplikaziorako garrantzitsuak izango direnak. Hala ere, azterketa fundamentalagoa egiteko helburuarekin, interesgarria da latexak lehortu aurretik daukan egitura ezagutzea. Horretarako, gel eduki hezea ere neurtu zen, 3. irudian ikusten den modura.

3. irudia. Gel hezearen bilakaera VAc-VTMS (□), VAc-VTES (▲) eta VAc-VSTO (●) kopolimeroentzat

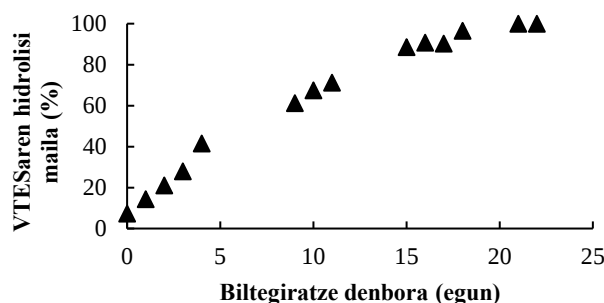


Interesgarria da ikustea hasierako puntuetan gel hezea eta lehorra ez datozela bat, bereziki VTMS eta VTESaz eraldatutako latexetan. Biltegitratze denbora 0 denean, VTMS eta VTESa daukaten latexek ez dute ia gel hezerik sortzen, film lehorrean gel kopuru nabaria sortzen duten arren. Kontuan hartuta gel hezeak egoera dispartsoan dagoen saretzea neurtzen duela, honek frogatzen duena da alkoxisilanoak erabiltzean saretzea filmaren eraketa prozesuan gertatu dela. VSTOa daukan kopolimeroak, bestalde, gel balio oso altua ematen du, partikulak erreakzio denboran saretuz joan direla adieraziz, eta lehorte prozesuan sartzeko tarte gutxi utziz.

Biltegitratze denbora aurrera doanean bai VTMSa bai VTESa daukaten kopolimeroen gel hezeak gora egiten du, eta VSTOaren kasuan gertatzen den moduan, film eraketan sartzeko daukan tarte txikituz. Ondorioz, emaitza honek erakusten duena da, lehorte prozesuan sortzen den gel edukia optimizatu nahi bada, silano bakoitzak biltegitratze denbora espezifikoak daukala.

VTESaren kasuan, monomeroaren hidrolisiaren jarraipena ere egin zen, gas kromatografia erabiliz askatutako etanol kontzentrazioa neurtuz (ikus 4. irudia). VTMSarekin ere jarraipena egin nahi izan zen baina ikusi zen lehenengo laginean jada guztiz hidrolizatua zegoela, hidrolisia erreakzio denbora gertatu zela adieraziz et ez zen jarraipenik egin.

4. irudia. VTESaren hidrolisiaren bilakaera biltegitratze denboraren aurrean

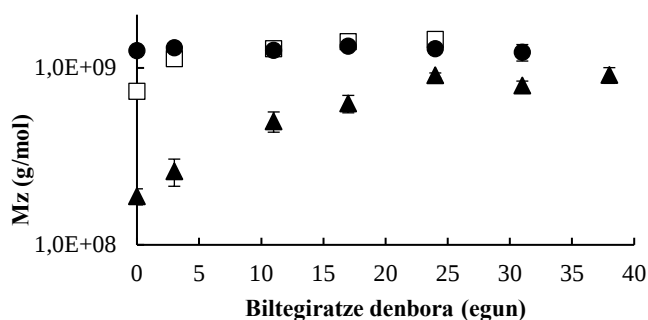


4. irudiak erakusten duen moduan biltegitratzearen hasieran hidrolisi maila arbuigarria da ia, baina 20 eguneko tartean guztiz hidrolizatzen da. Aipatzekoa da 4. eta 3. Irudiak konparatzen

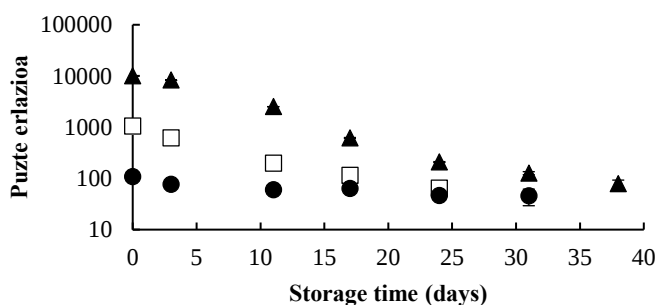
badira, VTESa daukan kopolimeroak ez duela gel hezerik sortzen silanoaren hidrolisi maila % 90 den arte.

Gel edukiaren neurketak (bai lehorra zein hezeak) erakusten du amaieran polimero guztiek antzeko balioak ematen dituztela. Antzeko gel edukia daukaten laginek desberdintasunik daukaten aztertzeko, lagin berberak AF4/MALSean karakterizatu ziren, pisu molekularren eta kateen biraketa erradioaren determinaziorako. 5. eta 6. irudietan aurkezten dira emaitzak. Garrantzitsua da kontuan hartzea neurketa hauek egiteko laginak ez zirela lehortu eta hortaz aztertzen den mikroegitura dispersioan dagoena dela.

5. irudia. Batez besteko pisu molekularren bilakaera VAc-VTMS (□), VAc-VTES (▲) eta VAc-VSTO (●) kopolimeroentzat



6. irudia. Batez besteko putze erlazioaren bilakaera VAc-VTMS (□), VAc-VTES (▲) eta VAc-VSTO (●) kopolimeroentzat



Gel edukiaren antzera, hasierako puntutik ikusten da silanoek eragin nabarmena daukatela neurtutako propietatean. Pisu molekularrari dagokionez VSTOak dauka balio handiena, VTMSak pixka bat txikiagoa eta VTESak nabari txikiagoa izanik. Puzte erlazioaren balioak, bestalde, pisu molekularren kontrako joera dauka; VSTOa txikiena izanik eta VTESa handiena.

Puzte erlazioak polimeroak disolbatzailea hartzeko daukan gaitasuna ematen du, eta saretze dentsitatearen alderantziz proportzionala da. Hau dela eta, informazio baliagarria ematen du kateen konformazioaren inguruan. VSTOak ez du bakarrik pisu molekular handiena, baizik eta saretze dentsitate altuena ere, kondentsazio erreakzioak polimerizazio prozesuan gertatu diren seinale. Beste muga VTESa daukan kopolimeroa daukagu, non kateen pisu molekularra txikiena izateaz gain, saretze dentsitatea ere txikiena da, polimerizazio denboran kondentsazio erreakzio gutxi gertatu baitira.

Biltegitratze denbora aurrera doanean, ikus daiteke batez besteko pisu molekularrak igo egiten direla, silanoa daukaten kateak elkarren artean kondentsazio erreakzioen bitartez elkartzen ari direnaren seinale. Puzte erlazioaren jaitsierak, bestalde, sortutako hiru dimentsiotako sarea gero eta konpaktuagoa egiten ari dela adierazten du.

Hortaz, emaitza hauek guztiz bat dator aurretik aurkeztutako emaitzekin, denbora aurrera doan heinean saretuz doan sistema baten portaera ikusten baita.

4. Ondorioak

Lan honetan alkoxisilanoekin eraldatutako emultsio kopolimeroak biltegitratzean daukaten portaera aztertu da.

Ikusi da aukeratutako alkoxisilanoak izugarrizko eragina daukala lortutako polimeroaren propietateetan, biltegitratze denborak motzak direnean. Izan ere, hidrolizatzen azkarrak diren (edo hasieratik hidrolizatuta dauden) silanoak erabiltzean saretze maila altuagoak lortzen dira VTMS eta VSTOaren kasuan) hidrolisi moteleko silanoekin baino (VTES).

Hala ere, garrantzitsuagoa da alkoxisilanoz eraldatutako kopolimeroak biltegitratze denborarekin aldatuz doazela, eta amaierarako kopolimero guztiek antzeko batez besteko saretze mailak lortzen dituztela, silanoa edozein izanda ere (hasierako balioekin konparatuz behintzat). Bilakaera honen abiadura silanoaren arabera da, eta arrazoia hidrolizatzen bukatu ez duen silanoa hidrolizatuz doala (lehortzean saretze puntu gehiago sortuz), eta aldi berean jada hidrolizatutako taldeak kondentsatzen doazela dispartzioan. Hau dela eta, silano bakoitzak denbora tarte bat dauka non dispartzioan oraindik saretu gabe dagoen, baina lehortu ondoren saretze maila altuak lortzen dituen. VTMSaren kasuan tartearen erreakzioa burutu ondoren da, eta VTESaren kasuan erreakzioa burutu eta 15 egun ondoren. VSTOaren kasuan, hasieratik saretze maila altua dauka erreakzioa bukatu den momentutik, eta hortaz ez da egokia saretzea film eraketan zehar sortzeko.

5. Etorkizunerako planteatzen den norabidea

Egindako lana oinarri moduan hartuta, interesgarria izango litzateke kopolimeroaren konposizioa aldatuz estaldura aplikazioetarako garrantzitsuak diren beste propietate batzuk aztertzea, hala nola propietate mekanikoak edo urarekiko sentikortasuna, eta hauek denborarekin aldatzen doazen aztertzea. Bestalde, hidrolisi motelagoa daukan alkoxisilano bat erabiltzea ere aukera ona da, polimeroek biltegitratze denbora luzeagoetan erabili daitezkeen ikusteko.

Amaitzeko, pinturak produktu konplexuak direnez, formulazio osoa daukan pintura baten portaera aztertzea ere interes handikoa izan daiteke, eta latex hutsak daukanarekin alderatzean ea gainerako osagaiekin dagoen interakzioak zer nolako eragina daukan ezagutzeko.

6. Erreferentziak

- Abd El-Ghaffar, M. A. (2016): "Novel high solid content Nano Siliconated poly (VeoVa-acrylate) Terpolymer latex for high performance latex paints", *Chemical Engineering Journal*, 301, 285-298.
- Dubininkas, M. eta Buika, G., (2013): "Dispersion production by semi-continuous radical vinyl acetate emulsion polymerization with silane co-monomer and characterization of final products", *Chinese Journal of Polymer Science (English Edition)*, 2, 346-354.
- Naghash, H. J. (2005): "Synthesis and Characterization of Silicone Modified Acrylic Resin and its Uses in the Emulsion Paints", *Iranian Polymer Journal*, 3, 211-222.
- Osterholtz, F. D. eta Pohl, E. R. (1992): "Kinetics of the hydrolysis and condensation of organofunctional alkoxysilanes: a review", *Journal of Adhesion Science and Technology*, 6, 127-149.
- Wituki, G. L. (1993): "A Silane Primer: Chemistry and Applications of Alkoxy Silanes", *Journal of Coatings Technology*, 822, 57-60.
- Zhang, S. W. (2008): "Film formation and mechanical properties of the alkoxysilane-functionalized poly (styrene-co-butyl acrylate) latex prepared by miniemulsion copolymerization", *Progress in Organic Coatings*, 65, 56-61.

7. Eskerrak eta oharrak

Eskerrak Euskal Herriko Unibertsitateari (UPV/EHU) eta POLYMAT institutuko *Industrial Liaison Program in Polymerization in Dispersed Media* (ILP) partzuergoari laguntza ekonomikoarengatik.

Forma-memoria materialak ezagutzen

Veloso, Antonio¹; Laza, José Manuel¹ eta Vilas, José Luis^{1,2}

¹*Kimika Makromolekularreko Laborategia, Kimika Fisika Saila, ZTF/FCT (UPV/EHU)*

²*Basque Center for Materials, Applications and Nanostructures (BCMaterials), Bizkaiko Zientzia eta Teknologia Parkea*

antonio.veloso@ehu.eus

Laburpena

Elastomeroak malgutasun handiko materialak bezala deskribatzen dira, honek esan nahi du karga edo indar baten ondorioz deformatzen direla, eta indar hori desagertzerakoan ia guztiz errekuiperatzen direla. Izan ere, hauen egituraren beirazko trantsizio-tenperatura baxuko kate molekular malguak eta uretano segmentu zurrinak txandakatuta aurkitzen dira. Poliuretanoen (PU) artean, forma-memoria PUak (SMPU) interes handikoak dira, propietate oso bereziak dituztelako, errekuiperazio tenperatura tarte zabala, esate baterako. Gainera, prozesatze ona, malgutasun, elastikotasun eta urradurarekiko erresistentzia ezin hobea daukate eta biobateragarriak dira. Lan honetan polimero hauen artearen egoera erakutsiko da, hau da, erabiltzen diren osagaiak (poliola, diisozianatoa eta kate hedatzailea) eta sintesia. Azkenik, nola karakterizatzen edo ebaluatzen den forma-memoria kapazitatea edo gaitasuna azalduko da analisi termomekanikoa (TMA) erabiliz.

Hitz gakoak: materialak, polimeroak, poliuretanoak, forma-memoria polimeroak.

Abstract

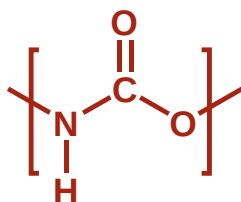
Elastomers are generally described as highly elastic materials, what it means that have the ability to be deformed under a load, and recover almost completely when the load stops. This elasticity, in case of polyurethanes (PUs), is the result of a particular molecular structure consisting of flexible molecular chains with low glass transition temperatures alternating with hard urethane segments. Among polyurethanes, shape memory PUs (SMPUs) generate great attention because of their unique properties, such as wide range of recovery temperatures. Moreover, these materials show good processability, flexibility, elasticity, good abrasion resistance and excellent biocompatibility. In this work, state of the art of this polymers is going to be shown, this is, the mixing components (polyol, diisocyanate and chain extender) and synthesis. Finally, the characterization or evaluation of shape memory capacity is explained by thermo-mechanical analysis (TMA).

Keywords: materials, polymers, polyurethanes, memory shape polymers.

1. Sarrera eta motibazioa

Poliuretanoak (PU) polimero talde handia osatzen dute, non propietate eta konposizio desberdinak bereizten diren. Hala ere, PU guztiek uretano taldea dute bere estrukturan (1. irudia). 1937an I.G. Farben konpainiak (Alemania) lehen poliuretanoaren sintesia garatu zuen, Heinrich Rinke ikertzaileak 1,6-hexametileno diisozianatoa (HDI) sintetizatu eta Otto Bayerrek kate-polimerizazioaren bidez konposatua lortu zuen. Polimerizazio mota honek, polimero linealak, adarkatuak edota sareztatuak sintetizatzeko aukera ematen du (Prisacariu, 2011; Adam et al., 2012). 1950. hamarkadan Bayer-Farbenfabriken (Alemania) eta B.F. Goodrich (Estatu Batuak) konpainiak poliuretanoak merkaturatzen hasi ziren, baina 1970. hamarkadaraino polimero hauen komertzializazioa ez zen garatu. Momentu honetatik, polimero hauen garapenak eta salmentak handitzen joan dira.

1. irudia. Poliuretano taldearen estruktura molekularra.



Gaur egun, poliuretanoek erabilera anitz dute beraien propietateak direla eta, hala nola urradurarekiko eta ultramore izpiko erresistentzia altua, gogortasun altua eta apurtzeko zailtasuna. Erabilerak arlo desberdinetan barreiatzen dira, adibidez eraikin industrian, kotxegintza, medikuntzan, elektronikan, ehungintzan. Gainera forma desberdinetan aurki dezakegu polimero hauek: aparrak edo bitsak, itsasgarriak, pinturak, zuntzak, eta abar. Azkenaldian, interes handia sortu da forma-memoria deituriko PUetan, zeinek nahiz eta indar batek eraginda formaz aldatzen duten, beste edozein polimeroak bezala, aukera dago beraien jatorrizko forma berreskuratzeko. Forma-memoria PUen erabileren artean ehun inteligenteak, bururdi bereziak, edota sutura autotenkagarriak daude, beraz izan behar duten trantsizio-tenperatura giza gorputzaren antzekoa izan behar da.

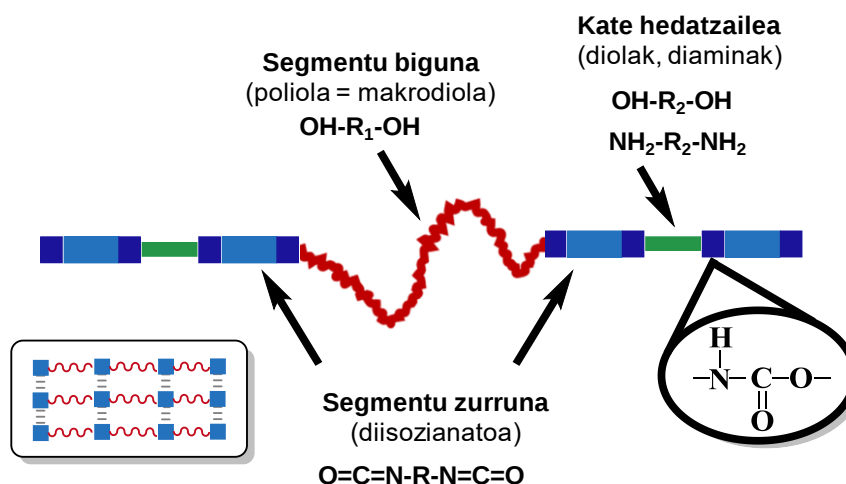
2. Arloko egoera eta ikerketaren helburuak

Lan honen helburua PUak nola sintetizatzen diren azaltzea da, forma-memoria duten PUak nabarmenduz. Horretarako, PU elastomeroen osagaiak eta estruktura azaldu eta gero sintesia erakutsiko da. Azkenik, forma-memoria efektua modu sinplean aztertzeke eta ebaluatzeke analisi termomekanikoa (TMA) erakutsiko da.

2.1. PU elastomeroen osagaiak eta estruktura

PU taldea osatzen da hiru errektibo desberdinak erreakzionaraziz: poliol bat (-OH talde errektiboa daukana), diisozianato bat (zianato talde errektiboak izanda, -N=C=O), eta kate hedatzailea (baita hidroxilo talde errektiboak ere daukana, -OH). Osagai guzti hauek elkartzen dira polimero bat sortzeko, non bi segmentu desberdinak bereizten diren: segmentu zurrun bat diisozianatoz eta kate hedatzailez osatuta, eta segmentu biguna, poliolez osatuta. Segmentu hauek txandaka ordenatzen dira. Errektiboen proportzioak aldatuz, polimeroaren propietate desberdinak lortzen dira, hau da, zurruntasun eta malgutasun desberdineko materialak lortzen dira.

2. irudia. Poliuretano elastomero baten egitura orokorra.



a) Poliolak

Erabiltzen diren poliolak (kate luzeko diolak) edo makrodiolak, polieter edo poliester modukoak dira, 500-5000 g/mol tarteko masa dituztenak (Hepburn, 1992). Polieter moduko poliolen artean, politetrahidrofuranoa (PTHF) (Hu, 2007; Sáenz et al., 2016), polietilenglikola (PEG) (Gu eta Mather, 2012) eta polipropilenglikola (Waletzko et al., 2009) ohikoenak dira. Askotan konposatu hauen nahasteak erabiltzen dira. Poliester moduko poliolen artean etileno poliadipatoa (PEA) (Prisacariu et al., 2003), polibutilenadipatoa (PBA) (Frensdorff, 1971) eta polikaprolaktona diola (PCL edo PCD) (Ratna eta Karger-Kocsis, 2008) erabiltzen dira. Normalean poliesterak erabiltzen direnean PU askoz zurrunagoak eta tenperatura altuagotan erresistenteagoak lortzen dira, aldiz, polieterrak erabilia hidrolisirako erresistenteagoak dira.

b) Diisozianatoak

Diisozianatoak PUen ezinbesteko osagaiak dira isozianato taldea (-NCO) baitute. Talde honek hidroxilo taldeekin (-OH) erreakzionarazten du PUak sortzeko. Bi motatakoak izaten dira: aromatikoak eta alifatikoak. Aromatikoen artean, gehien erabiltzen direnak edo aipagarrienak: tolueno 2,4-diisozianatoa (TDI) eta 4,4'-metilen bis(fenilisozianatoa) (MDI); eta alifatikoen artean, 2,2,4-trimetil-1,6-hexametilendiisozianatoa (TMDI) eta hexametilenoren 1,6-diisozianatoa (HDI) (Chattopadhyay eta Raju, 2007). Mota bateko edo besteko diisozianatoak erabiltzeak (alifatikoak edo aromatikoak) PU-en propietateetan ere eragina du. Aromatikoak erabiltzen direnean lortzen diren PUek trakzioarekiko erresistenteagoak dira eta egonkortasun termiko handiagoa izaten dute, baina askoz errazago degradatzen dira UM erradiazioaz (Gogolewski, 1989; Javni et al., 2003; Yeh et al., 2003). Bestalde, alifatikoak erabiltzerakoan UM erradiazioarekiko eta hidrolisirako erresistenteagoak dira eta segmentu zurrun malguagoak dituzte.

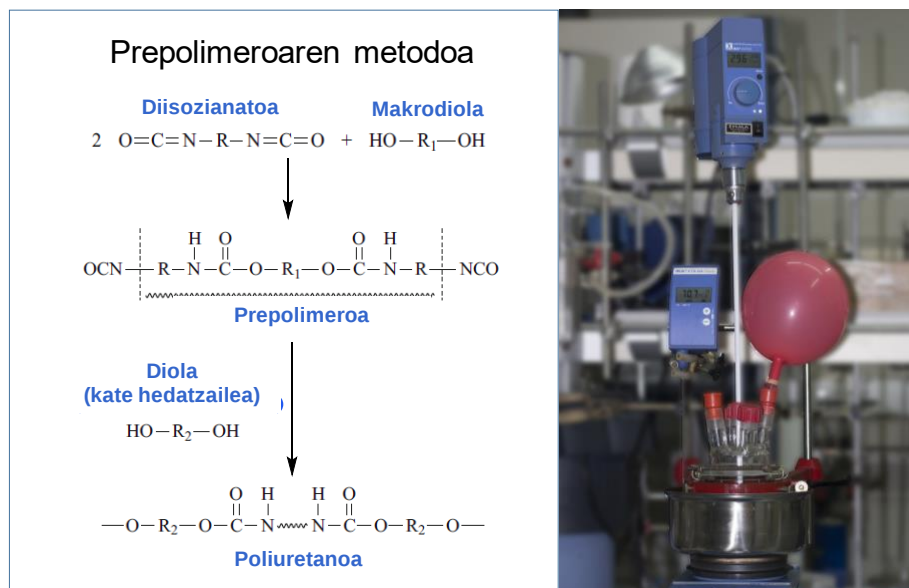
c) Kate hedatzaileak

Normalean pisu baxuko diolak erabiltzen dira (< 400 g/mol) kate hedatzaile moduan, baina askotan pisu baxuko diaminak ere erabiltzen dira. Konposatu hauek diisozianatorekin erreakzionatzen dute segmentu zurruna sortzeko. Diol modukoak adibide gisa etilenglikola (EG), 1,4-butanodiola (BD), dietilenglikola (DEG) eta A bisfenola (BA) erabiltzen dira. Diamina taldeak dituztenen artean 2,6-diaminopiridina (DAPy) eta 4,4'-diaminodibenzilola (DAB) erabilienak izaten dira (Prisacariu et al., 2005).

2.2. PU sintesia

PU sintetizatzeko bi metodo erabiltzen dira: prepolimeroaren metodoa eta “one shot” metodoa. Bi metodo hauek prozesuaren etapetan bereizten dira. “One shot” metodoan, prozesua etapa bakar batean ematen da errektibo guztiak aldi berean nahastuz. Prepolimeroaren metodoan, lehendabizi diisozianatoa eta makrodiola erreakzionarazten dira nahaste likatsua lortuz eta gero kate hedatzailea gehitzen da poliuretanoa lortzeko (3. irudia).

3. irudia. Ezkerraldean prepolimero metodoaren eskema. Eskuinaldean poliuretanoak sintetizatzeko muntaia.



3. Ikerketaren muina

Atal honetan, forma-memoriak polimeroak zer diren eta propietate berezi hau aztertzeke edota karakterizatzeko erabiltzen den teknika garrantzitsuena azalduko da.

3.1. Forma-memoria polimeroak

1932. urtean forma-memoria efektua lehen aldiz urre-kadmio aleazio batean behatu zen (Srinivasan eta McFarland, 2001). Material batek forma-memoria duela esaten da deformatzen bada eta deformazio hori denbora jakin batean mantentzen badu eta estimulu bat aplikatuz hasierako forma berreskuratzen badu. Estimulu hori beroa, argia, hezetasuna, elektrizitatea, magnetismoa, presioa, tentsioa edo pH aldatzean datza (Huang et al., 2011). Forma-memoria materialak aleazio, zeramika edo polimeroetan sailkatzen dira. Hauen artean, polimeroak dira fabrikatzeko merkeenak, gehien deformatzen direnak eta toxikotasun baxukoenak. Gainera, forma-memoria polimeroak (SMP) biodegradagarriak, biobateragarriak eta birziklagarriak izan daitezke.

1984an CdF Chime konpainiak (Frantzia) lehen SMP sintetizatu zuen, polinorbornenoa. Egun, SMP material desberdinak daude: butadieno-estireno kopolimeroak, poliestireno retikulatuak, poliziklooctenoak, poliisoprenoak, poliuretanoak, eta abar (Wang eta Zhang, 1999; Axpe et al., 2015).

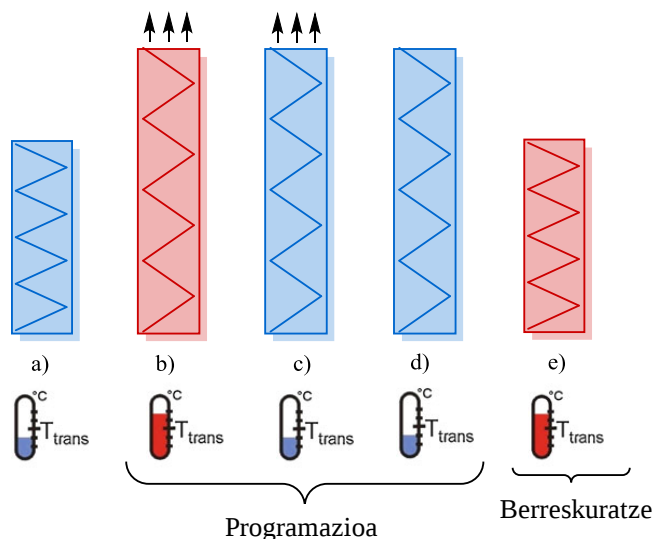
Normalean forma-memoria efektua eragiteko beroa erabiltzen da (Cuevas, 2011), modu honetan materialak tenperatura batean aldaketa estruktural bat jasaten du. Tenperatura honi trantsizio-tenperatura deritzogu (T_{trans}). Polimero kristalinitatearen arabera tenperatura hori fusio tenperatura izan ahal da (T_m), edo beirazko trantsizio-tenperatura (T_g), beraz materialaren forma aldaketak tenperatura horren gaineretik edo azpitik gertatuko dira. Forma-memoria efektua agertzen da materialaren estrukturan bi fase aurkitzen direlako. Fase batek polimero sare

egonkorra osatzen du eta hasierako forma ezartzen du materialean. Bigarren fasea, fase itzulgarria da eta trantsizio-tenperatura azpitik materiala denbora tarte batean forma bat mantentzeaz arduratzen da.

Polimero hauen forma-memoria ahalmena ebaluatzeko analisi termomekanikoa (TMA) erabiltzen da. Horrela, deformazioaren ehunekoa, aldi baterako forma finkapen ahalmena eta errekuaratzeko gaitasuna neurtzen da. Horretarako, aztertu nahi den materialaren dimentsio ezaguneko forma prestatzen da, honi probeta esaten zaio. Indar bat eraginda probeta honen dimentsio aldaketak neurtzen dira tenperaturarekiko.

Material baten forma-memoria ebaluatzeko termomekaniko zikloak erabiltzen dira (4. irudia). Ziklo bakoitzak bi etapetako prozesuan datza: programazioa (deformazioa eta finkapena), eta berreskurapena. Tenperatura baxuetan (T_{trans} azpitik) materiala zurrunda da (4a. irudia). Polimeroa berotzen denean, T_{trans} gainetik polimeroa biguntzen da eta indar bat aplikatzean deformatzen da (4b. irudia). Indar hau mantentzen bada, nahiz eta T_{trans} azpitik egon, polimeroaren forma mantentzen da (4c. irudia). Momentu honetan nahiz eta indarririk ez egin polimeroaren forma mantentzen da (4d. irudia). Azkenik, materiala T_{trans} gainetik berotuz, hasierako forma berreskuratzen badu, orduan forma-memoria materiala dela esan daiteke (4e. irudia).

4. irudia. Termoeragindako forma-memoria efektuaren irudikapen eskematikoa.



4. Ondorioak

Forma-memoria polimeroak interes handiko materialak dira zenbait aplikaziotan erabiltzeko aukera ematen dutelako. Hauen artean poliuretanoek propietate ezin hobeak erakutsi dute. Gainera, sintetizatzeko erabiltzen diren materialak ez dira aleazio bezain toxikoak eta lortutako produktuak biodegradagarriak, biobateragarriak eta birziklagarriak izan daitezke. Bestalde, sintetizatzeko erabili behar diren metodoak oso erosoak eta sinpleak dira, beraz aukera anitz dago industrian ezartzeko. Bestalde, tenperaturak duen eragina forma-memoria efektuan modu sinplean aztertzeko eta ebaluatzeko analisi termomekanikoa (TMA) erakutsi da.

5. Etorkizunerako planteatzen den norabidea

Lan honetatik abiatuta ikerkuntzan zenbait erronka planteatzen dira. Alde batetik, biodegradagarriak diren PUak sortzea eta errektibo ez toxikoak erabiltzea (disolbatzaileak, batez ere). Beste aldetik, ehungintzan erabiltzeko, erabilpenaren arabera lortu behar diren polimero hauen beirazko trantsizio-tenperatura desberdinak izango dira. Gizakien arropetan erabiltzeko, adibidez, tenperatura hori gizakien gorputzaren ohiko tenperatura izan behar da, hots, 37°C ingurukoa izan behar dira, baina onetakoak egiteko inguruko tenperaturaren arabera

aukeratuko dira trantsizio-tenperaturak, ez baitira temperatura berdinak herrialde tropikaletan edo poloetan. Amaitzeko, polimero hauek haritzeko oraindik teknikak garatu behar dira, ehungintzan aplikagarriak izateko eta gure eguneroko bizitzan erabiltzen hasteko.

6. Erreferentziak

- Adams, N., Adam, N., G Avar, G., Blankenheim, H., (2012). *Polyurethanes. Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.
- Axpe, E., García-Huete, N., Cuevas, J., Ribeiro, C., Mérida, D., Laza, J., García, J., Vilas, J., Lanceros-Méndez, S., Plazaola, F., León, L. (2015). Connecting free volume with chape memory properties in noncytotoxic gamma-irradiated polycyclooctene. *J. Polym. Sci. Part B: Polym. Phys.*, 53, 1080-1088.
- Chattopadhyay, D., Raju, K. (2007). Structural engineering of polyurethane coatings for high performance applications. *Progress in Polymer Science.*, 32(3), 352-418.
- Cuevas, J. (2011). Desarrollo y caracterización de la capacidad de memoria de forma en polímeros semicristalinos. Doktoretza tesia, Euskal Herriko Unibertsitatea, Leioa.
- Frensdorff, H. (1971). Block-frequency distribution of copolymers. *Macromolecules* 4(4), 369-375.
- Gogolewski, S. (1989). Selected topics in biomedical polyurethanes. A review. *Colloid & Polymer Science*, 267, 757-785.
- Gu, X., Mather, P. (2012). Entanglement-based shape memory polyurethanes: synthesis and characterization. *Polymer*, 53, 5924-5934.
- Hepburn, C. (1992). *Polyurethane Elastomers*. Elsevier Applied Science, Londres.
- Hu, J. (2007). *Shape Memory Polymers and Textiles*. Woodhead publishing limited, Cambridge.
- Huang, W., Yang, B., Yong, Q. (2011). *Polyurethane Shape Memory Polymers*. CRC Press. Boca Ratón, Florida, Estatu Batuak.
- Javni, I., Zhang, W., Petrovic, Z. (2003). Effect of different isocyanates on the properties of soy-based polyurethanes. *Journal of Applied Polymer Science*, 88(13), 2912-2916.
- Prisacariu, C. (2011). *Polyurethane Elastomers*. Springer, New York, Estatu Batuak
- Prisacariu, C., Buckley, C., Caraculacu, A. (2005). Mechanical response of dibenzyl-based polyurethanes with diol chain extension. *Polymer*, 46(11), 3884-3894.
- Prisacariu, C., Olley, R., Caraculacu, A., Bassett, D., Martin, C. (2003). The effect of hard segment ordering in copolyurethane elastomers obtained by using simultaneously two types of diisocyanates. *Polymer* 44(18), 5407-5421.
- Ratna, D., Karger-Kocsis, J. (2008). Recent advances in shape memory polymers and composites: a review. *J. Mater. Sci.*, 43, 254-269.
- Sáenz, M., Lizundia, E., Laza, J., García, J., Vilas, J., León, L. (2016). Methylene diphenyl diisocyanate (MDI) and toluene diisocyanate (TDI) based polyurethanes: thermal, shape-memory and mechanical behavior. *RSC Advances*. 6, 69094-69102.
- Srinivasan, A., Mcfarland, D. (2001). *Smart Structures: Analysis and Design*. Cambridge University Press, U.K.
- Waletzko, R., Korley, L., Pate, B., Thomas, E., Hammond, P. (2009). Role of Increased Crystallinity in Deformation-Induced Structure of Segmented Thermoplastic Polyurethane Elastomers with PEO and PEO-PPO-PEO Soft Segments and HDI Hard Segments. *Macromolecules* 42(6), 2041-2053.
- Wang, M., Zhang, L. (1999). Recovery as a measure of oriented crystalline structure in poly(ether ester)s based on poly(ethylene oxide) and poly(ethylene terephthalate) used as shape memory polymers. *J. Polym. Sci. Part B: Polym. Phys.*, 37, 101-112.
- Yeh, F., Hsiao, B., Sauer, B., Michel, S., Siesler, H. (2003). In-Situ Studies of Structure Development during Deformation of a Segmented Poly(urethane-urea) Elastomer. *Macromolecules*, 36(6), 1940-1954.

7. Eskerrak eta oharrak

Egileek erakundeek (UPV/EHU eta GV/EJ) emandako laguntza (ELKARTEK programa, ACTIMAT) gizatiarra eskertzen dute.

Euskal kostako estuarioetan bertakoa ez den zooplanktonaren eraginaren analisisa

Barroeta, Ziortza¹; Uriarte, Ibon²; Villate, Fernando¹ eta Arantza Iriarte ²

¹Landareen Biologia eta Ekologia Saila, Zientzia eta Teknologia Fakultatea, Euskal Herriko Unibertsitatea UPV/EHU eta Itsas Biologia eta Bioteknologia Esperimentalen Ikerketa Zentroa (Plentziako Itsas Estazioa; PiE-UPV/EHU)

²Landareen Biologia eta Ekologia Saila, Farmazia Fakultatea, Euskal Herriko Unibertsitatea UPV/EHU eta Itsas Biologia eta Bioteknologia Esperimentalen Ikerketa Zentroa (Plentziako Itsas Estazioa; PiE-UPV/EHU)
ziortza.barroeta@ehu.eus

Laburpena

Ekosistemen biodibertsitate eta funtzionamenduaren gaineko mehatxu nagusietako bat bertakoak ez diren espezieen (BEDE) sartzea da, eta haien balizko inbaditzaile-bilakaera. Sistema sentikorrak diren estuarioetan agerikoagoa delarik. Azken hamarkadetan, BEDE diren hiru kopepodo (*Acartia tonsa*, *Oithona davisae* eta *Pseudodiaptomus marinus*) Bilboko eta Urdaibaiko estuarioetan agertu dira. *A. tonsa* espeziearen kasuan, Bilboko barne-estuarioan kopepodo nagusia bilakatu delarik. Hala ere, ez da ezaguna hiru espezie horien bertako zooplankton-komunitateen egitura, dinamika eta funtzionamenduaren gaineko eragina, ezta euskal kostaldeko gainontzeko estuarioetara balizko hedapena ere. Ikerketa honetako emaitzek aspektu horiek guztiak argitzeko xedea dute.

Hitz gakoak: bertakoak ez diren espezieak (BEDE), estuarioak, inbaditzaileen eragina, kopepodoak, zooplanktona.

Abstract

*One of the most concerning hazards on ecosystem biodiversity and its functioning is the introduction of non-indigenous species, which are able to become invasive. This phenomenon is more relevant in systems that are more vulnerable as estuaries. In the last decades, the occurrence of three NIS copepods (*Acartia tonsa*, *Oithona davisae* and *Pseudodiaptomus marinus*) in the estuaries of Bilbao and Urdaibai was observed. *A. tonsa* for instance, has become the dominant species of the inner part of the estuary of Bilbao. However, the impact of those species on the structure, dynamic and functioning of the native zooplankton community is unknown, as well as, their spread to other estuaries of the Basque coast. Therefore, the aim of this research is to determine those aspects.*

Keywords: non-indigenous species (NIS), estuaries, impact, copepod, zooplankton.

1. Sarrera eta motibazioa

Inbasio biologikoak biodibertsitate-galeraren eta ekosistemen gaineko eragina (ekologikoa zein ekonomikoa) duten faktore garrantzitsuenetarikoak dira (MEA, 2005). Bertakoak ez diren espezieak (BEDE) inbaditzaile bilaka daitezke eta bertakoak diren espezieak ordezkatu. Horren ondorioz, hainbat eragin sor ditzakete, hala nola bertako genotipoen galerak, habitaten aldakuntzak eta komunitateen egituraren, sare trofikoaren ezaugarrietan eta ekosistemen prozesuetan aldaketak. Hori dela eta, ekosistema-zerbitzuen hornidura eragotziko litzateke eta hortaz, giza osasunaren eta ekonomiaren gaineko eragin negatiboak areagotuko lirateke (Vilà et al., 2010). Itsas ekosistemen kasuan, eta egungo mundu globalizatu honetan, merkataritzaren, bidaien eta garraiobideen azken hamarkadetako gehitze azkarrak itsas inbasio biologikoak areagotu ditu, nabarmenki estuarioetan (Williams eta Grosholz, 2008). Izan ere, estuarioak itsas eta lehorreko ekosistemen arteko elkarguneak izanik, BEDE-ak sartzeko aukera handiak dauzkate, sarrera-bektore nagusiei dagozkien jardueren guneak baitira, hala nola, itsas garraioa (kindurtzako ura), nabigaziorako kanalen eraikuntza, akuikultura eta akuarioria (Williams eta Grosholz, 2008; Katsanevakis et al., 2014). Ondorioz, oso ekosistema mehatxatuak dira eta inbasio biologikoen aurrean sentiberatasun handia erakusten dute (Barbier et al., 2011).

Dibertsitate Biologikoari buruzko Hitzarmenak (CBD, 2000) dibertsitate biologikoaren, habitaten eta ekosistemen gaineko eragina duten BEDE-i buruzko ikerketak ugaritzea eta dagoen informazio guztia biltzea eta zabaltzea azpimarratzen du, gerora prebentzio- eta eztitze-jardueretan erabiltzekotan. Europar Batasunean, adibidez, Itsas Estrategiari buruzko Esparru-Zuzentarauak (EU, 2008) BEDE-ak Europako biodibertsitaterako eta ekosistema-osasunerako mehatxu handiena aintzat hartzen ditu.

2. Arloko egoera eta ikerketaren helburuak

2.1. Arloko egoera

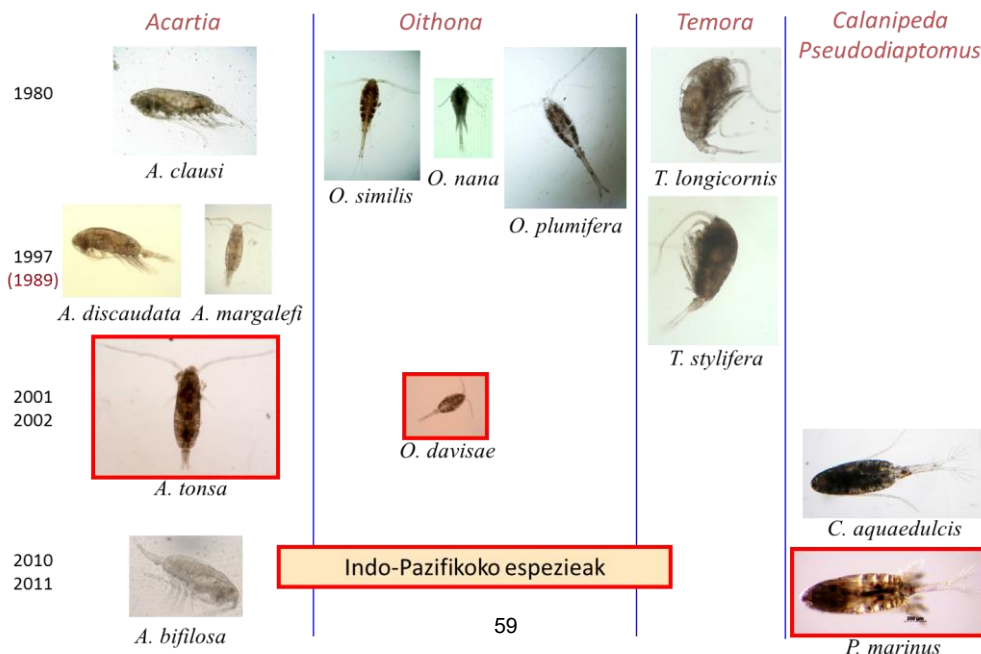
BEDE-ak inbaditzaile bilakatzen diren ikertzea funtsezkoa da ekosistemen estatus ekologikoa eta ekosistema-zerbitzuen gaineko eragina ebaluatzeko eta kudeaketa eraginkorrak garatzeko (Pantel et al., 2017). Askotariko BEDE-ak daude lehorrekoak zein urtarak, aski ezagunak diren zebra muskuilua (*Dreissena polymorpha*) edota kortaderia landarea (*Cortaderia selloana*), adibidez. Hala ere, itsasoko BEDE-en artean aipatu beharrekoak kopepodoak dira, zooplanktonean dominanteak diren krustazeo txikiak.

Euskal kostaldeko estuarioetan agerturiko BEDE-en artean *Acartia tonsa* kopepodo kalanoidea dago (Katsanevakis et al., 2014), estuario eta itsasalde berriak kolonizatu dituen (Frisch et al., 2006), berezko barreiatzearen edota gizakiok eragindako sartzearen bitartez, hein handi batean, barrera geografikoak gainditzeko gaitasunari eta, batez ere, erresistentzia-faseei (Belmonte eta Potenza, 2001) esker. Euskal kostaldeko estuarioetan lehenengo aldiz 2001ean identifikatu zen, Bilboko estuarioan, hain zuzen. Harrezkero, barne-estuarioko zooplanktonaren kalanoide nagusia da (Aravena et al., 2009). Urdaibaiko estuarioan ere hauteman da bere presentzia. Hala ere, hori ez da euskal kostaldeko estuarioetan aurkitutako BEDE kopepodo planktoniko bakarra. Izan ere, beste bi espezieren ondoz ondoko etorrera ere hauteman da; *Oithona davisae* eta *Pseudodiaptomus marinus*, hain zuzen (1. irudia). Horrek hainbat sistemetara espezie horien pixkanakako hedapena argi erakusten du (Ajeel, 2017; Bandpei et al., 2017; Cornils eta Wend-Heckmann, 2015; Gubanov et al., 2014). *A. tonsa*ren kasuan haren biologia eta ekofisiologiari buruzko bibliografia zabala dago (besteak beste, Peck et al., 2014; Svetlichny eta Hubareva, 2014), gainerako bi espeziei buruzko ikerketak, berriz, askoz urriagoak dira (Svetlichny eta Hubareva, 2014; Vogt et al., 2013), baita ekosistemetan haien sartzearen kausa eta ondorioak ere (Katsanevakis et al., 2014; Sabia et al., 2015; Zenetos et al., 2012).

1. irudia. Bilboko estuarioan agertu diren zooplankton espezie berriak. Karratu gorriaren barnean daudenak BEDE-ak dira.

BILBOKO ESTUARIOA

Zooplankton espezie berriak



Testuinguru horretan, jakiteko dago oraindik zein izan daiteke Bilboko eta Urdaibaiko estuarioetan aurkituriko BEDE-n berezkoa den zooplanktonaren dibertsitate, abundantzia eta banaketaren gaineko eragina, haien nitxo ekologikoen doitasuna, sare trofikoaren maila desberdinetan eragindako ondorioak, ezta euskal kostaldeko gainontzeko estuarioetara balizko hedapena ere.

2.2. Ikerketaren helburuak

Bilboko eta Urdaibaiko estuarioetan BEDE-ak diren *A. tonsa*, *O. davisae* eta *P. marinus* espezieek izan dezaketen dibertsitatearen eta ekosistema-funtzionamenduaren gaineko eragina aztertzea da helburu orokorra. Helburu zehatzak honako hauek lirateke:

- 1) Bilboko eta Urdaibaiko estuarioetan, osotasunean zein estuario bakoitzeko gazitasun-gune desberdinetan, BEDE-ek plankton-koepodoen eta zooplankton osoaren abundantzia (eskala absolutuan zein erlatiboan) izan duten ekarpena estimatzea, transferentzia trofikoaren balizko eragina zehazteko asmoz.
- 2) Bi estuarioen osotasunean zein estuario bakoitzeko gazitasun-gune desberdinetan, plankton-koepodoen eta zooplankton-taldeen dibertsitatearen denboran zeharreko aldaketan eta bertokoak ez diren espezieen sartzearen erlazioa ikertzea, zooplankton-komunitate egituraren gaineko eragina zehazteko asmoz.
- 3) BEDE-en ingurune-faktoreen aldakortasunarekiko erantzuna ikertu eta, Bilboko eta Urdaibaiko estuarioetan sartu aurretik eta sartu ondoren, BEDE-en eta bertakoen nitxo ekologikoak zehaztea, lehiaketa-maila eta BEDE-ek bertakoen gaineko eragina zehazteko asmoz.

3. Ikerketaren muina

3.1. Datuen lorpena

1997an Bilboko eta Urdaibaiko estuarioetan oinarritzko ingurune-faktoreen eta zooplankton-komunitateen jarraipen-programa bat abiatu zen. Hilero estuario bakoitzeko 4 gazitasun-gune zehaztuetan (Bilbon 35, 34, 33 eta 30eko gazitasun-guneetan eta Urdaibain 35, 33, 30 eta 26ekoetan) profil bertikalak egiten dira zunda multiparametrikoko (YSI 556MPS) baten bidez, ur-zutabeko gazitasun, tenperatura, oxigeno disolbatu eta pH-aren balioak eskuratzeko. Haloklinaren azpitik eta botila ozeanografiko (Niskin) baten bidez, ur laginak hartzen dira, klorofila *a* neurtzeko asmoz, horretarako azetona-aterakinekiko metodo espektrofotometrikoa erabiltzen da (Jeffrey eta Mantoura, 1997). Horrekin batera, zooplankton-laginak ere hartzen dira, 200 µm-ko plankton-sare baten arraste horizontalaren bidez. Lagin horiek % 4-5eko formolean gordetzen dira, gerora mikroskopia alderantzikatuan banakoak zenbatu eta identifikatzeko (espezie mailan, ahal den neurrian). Era horretan, ingurune- eta zooplankton-datuei buruzko etengabeko denbora-sekuentzia eskuragarri dago hileroko eskalan, estuario bakoitzean BEDE-en ondoz ondoko sarrera eta gerorako eraginak ikertzea ahalbidetuko duena. Ikerketa honen kasuan, 1998tik 2015erako datuak erabiliko dira.

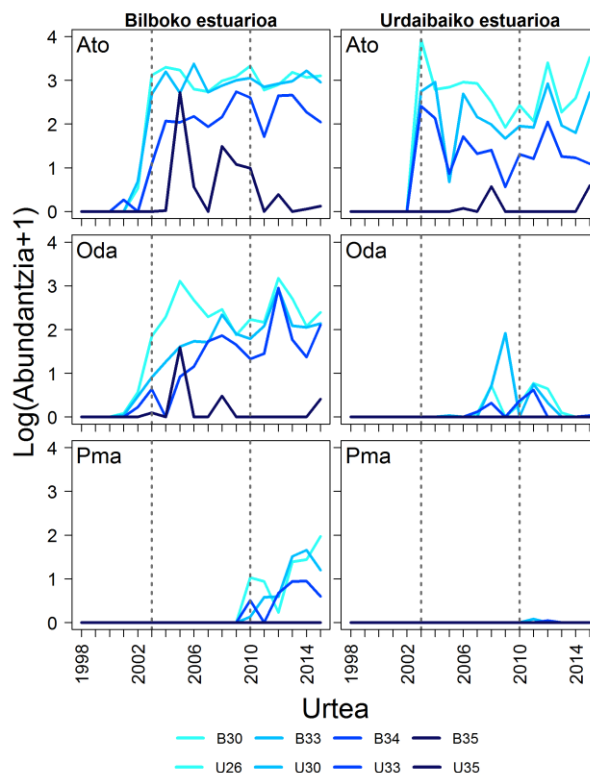
3.2. Bertakoak diren espezieen abundantzien gaineko eragina

BEDE-en abundantzien aldaketak eta bertokoak diren espezieen abundantzietan duten eragina ikertzeko, Bilboko eta Urdaibaiko estuarioetako gazitasun-gune bakoitzean zein osotasunean BEDE-en garrantzia dentsitate (banakoak m⁻³) bidez estimatu zen. Hasteko, hiru periodo desberdinetan banatu zen ikerketa seriea: lehenengo periodoa, 1998tik 2002ra, BEDE-en presentzia nulu edo aintzat ez hartzekoa izan zenean; bigarren periodoa, 2003tik 2009ra, bi estuarioetan *A. tonsa* eta *O. davisae* ondo ezarrita zirenean; eta hirugarren periodoa, 2010etik 2015era, *P. marinus*en sarrera eta ezarpena gertatu zenean. Horrela, periodoen artean konparaketak eginez, bai BEDE horien bai bertoko espezieen abundantzietan aldaketa esangarririk gertatu zen edo ez behatu zen.

Bilboko estuarioan *A. tonsa* eta *O. davisae* espezieek izugarritzko arrakasta lortu zuten agertu eta berehala. Izan ere 30 eta 33 gazitasun-guneetako espezie dominanteak bilakaturik, batez ere uda garaian. *P. marinus* koepodoak, berriz, arrakasta gutxiago izan du, dentsitate txikietan agertzen baita, baina behintzat, populazio egonkor bat mantentzea lortu du. Urdaibaiko

estuarian, *A. tonsa* arrakasta lortu zuen ere agertu eta berehala, baina uda sasoian soilik bilakatzen da espezie dominante. *O. davisae* ez du Bilbon bezain besteko arrakasta lortu, oso dentsitate txikietan agertu baita. Azkenik, *P. marinus* ez da izan populazio egonkor bat mantentzeko gai estuario honetan, nahiz eta kolonizatze hainbat saiakera izan dituen (2. irudia).

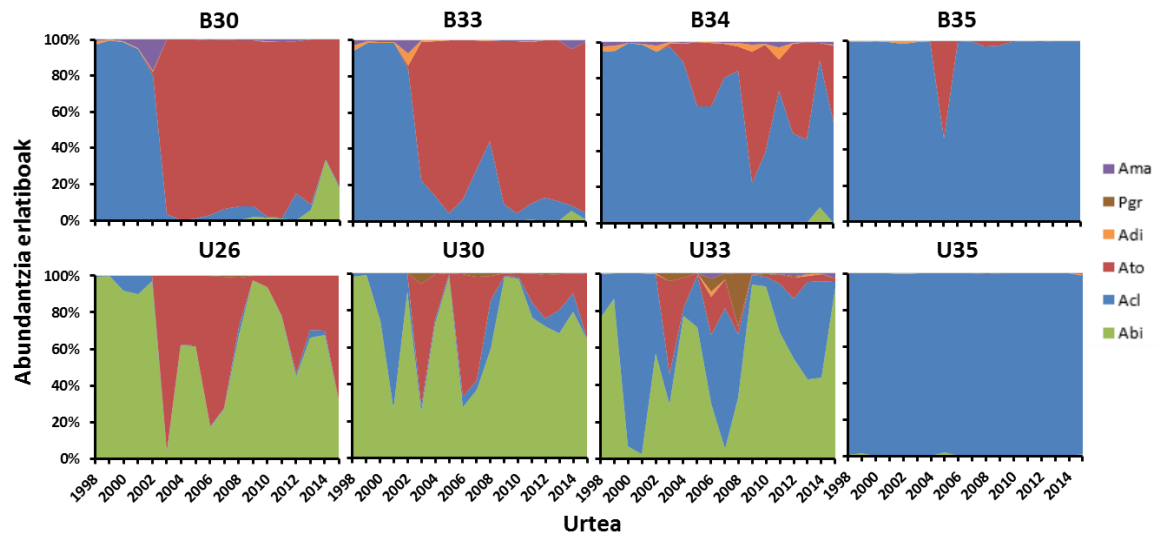
2. irudia. *Acartia tonsa* (Ato), *Oithona davisae* (Oda) eta *Pseudodiaptomus marinus* (Pma) abundantzien (logaritmoa) urtez urteko aldaketa Bilboko eta Urdaibaiko estuarioko gazitasun-gune desberdinetan.



A. tonsa eta *O. davisae* agerraldiak bertakoak diren espezie kogenerikoen abundantzien gaineko eragina izan dutela ematen du (3.irudia), azken horren kasuan Bilboko estuarioan baino ez. Bilboko estuarioan, esate baterako, *A. tonsa* lehen 30 eta 33 gazitasun-guneetan nagusi zen *A. clausi* espeziea ordezkatu du. 34 gazitasun-gunean, ordea, eragina ez da izan horren bortitza, bi espezieen presentzia behatu baita eta 35 gazitasun-gunean *A. tonsa* ez da garatu. Joera bera ikusi da Portugaleko Mondego estuarioan, non bi espezie horiek bereizita agertu ziren estuarioan zehar, *A. tonsa* gazitasun txikietan nagusi izanik eta *A. clausi*, berriz, gazitasun handietan (Azeitero et al., 2005). Gainontzeko genero bereko espezieetan (*A. margalefi* eta *A. discaudata*) ez du ematen eraginik sortu duenik, baina, aipatu beharra dago, espezie hauek dentsitate baxuetan agertu direla ikerketa periodo osoan.

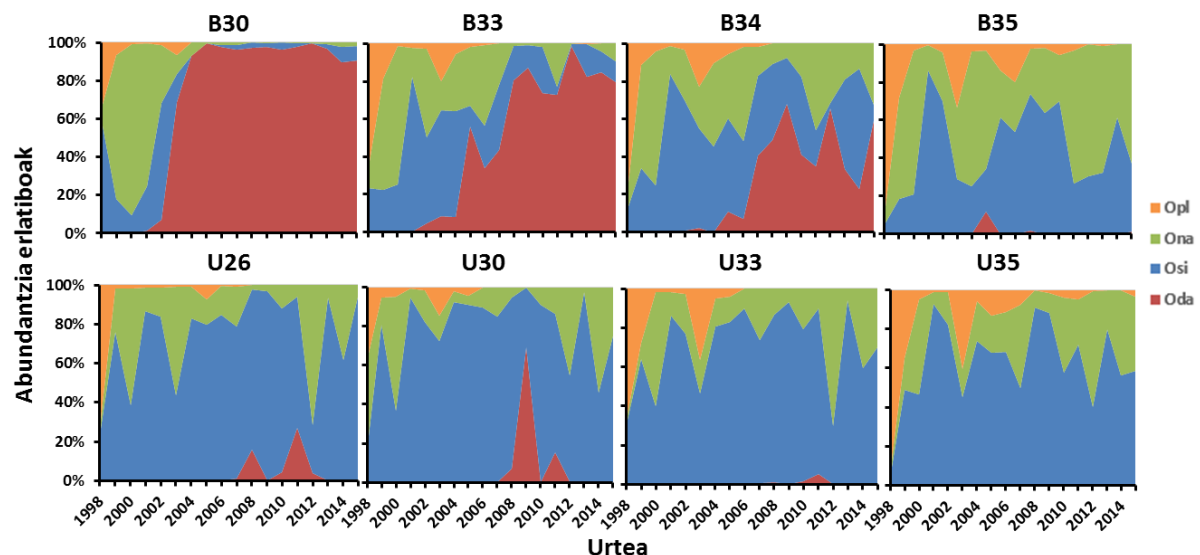
Beste alde batetik, Urdaibaiko estuarioan *A. tonsa* agertu baino lehen *A. bifilosa* zen espezie nagusia 26 eta 30 gazitasun-guneetan eta *A. clausi* 35ean. 33 gazitasun-gunean, ordea, bi espezieak eremu berean bizi ziren. Hala ere, *A. tonsa* agerpenaren ondoren, *A. bifilosaren* garrantzia nabarmen txikitu egin da, eta jada ez da espezie nagusi bakarra. Girondeko estuarioan ere, antzeko gertaera ikusi da, *A. tonsa* agerpenaren ondoren bertakoa den *A. bifilosa* espeziearen ordezkapena suertatuz (David et al., 2007). 33 gazitasun-gunean, ordea, *A. tonsa* agertu eta lehenengo urteetan hiru espezieen arteko lehia susma daiteke, baina azken urteetan *A. tonsa* garrantzia murriztu egin da. 35 gazitasun-gunean, Bilbon bezala, *A. tonsa* presentzia garrantzirik gabea da. Kasu honetan ere, gainontzeko genero bereko espezieetan (*A. margalefi* eta *Paracartia grani*) ez da eraginik nabarmendu (3.irudia).

3. irudia. *Acartia* generoko espezieen abundantzia erlatiboaren aldaketak ikerketa seriean zehar Bilboko eta Urdaibaiko gazitasun-gune bakoitzean. Ama: *A. margalefi*; Pgr: *Paracartia grani*; Adi: *A. discaudata*; Ato: *A. tonsa*; Acl: *A. clausi*; Abi: *A. bifilosa*.



*O. davisae*ren kasuan, berau agertu aurretik Bilboko estuario osoan *O. similis* eta *O. nana* espezieak aldi berean egoten ziren gazitasun-gune guztietan eta 35 gazitasun-gunean *O. plumifer*aren presentzia ere agerian izan zen noizbehinka. Aldiz, *O. davisae*ren sarreraren ondoren, espezie nagusi bilakatu da *Oithona* generoaren baitan 30 eta 33 gazitasun-guneetan, batez ere *O. nana*ren abundantziak jaitsiz. Itsaso Beltzan egindako ikerketaren arabera (Yildiz et al., 2016), *O. davisae* espezieak bertakoa den *O. nana* ordezkatzeko du etorkizun hurbilean. 34 gazitasun-gunean, ordea, bere eragina ez da izan horren nabaria eta 35 gazitasun-gunean ez da garatu (4. irudia).

4. irudia. *Oithona* generoko espezieen abundantzia erlatiboaren aldaketak ikerketa seriean zehar Bilboko eta Urdaibaiko gazitasun-gune bakoitzean. Opl: *O. plumifera*; Ona: *O. nana*; Osi: *O. similis*; Oda: *O. davisae*.



4. Ondorioak

A. tonsa espeziea bai Bilboko bai Urdaibaiko estuarioetako barneko gazitasun-guneetako kopepodo espezie nagusi bilakatu da agertu eta berehala, eta genero bereko beste espezieen nagusitasunaren ordezkapena eragin du. *O. davisae*ek arrakasta berbera izan du Bilboko estuarioan baina ez da horrela izan Urdaibairen kasuan. *P. marinus*en kasuan, populazio egonkor baina ez horren handia mantentzea lortu du Bilboko estuarioan eta Urdaibain nahiz eta kolonizazio agerraldiak suertatu diren, hauek ez dira arrakastatsuak izan.

5. Etorkizunerako planteatzeko den norabidea

5.1. Dibertsitatearen gaineko eragina

BEDE-ek duten zooplankton-dibertsitatearen gaineko eragina zehazteko, α dibertsitatearen denboran zeharreko aldaketa ikertuko da. Horretarako, hileroko eskalan hainbat indize unibariante kalkulatu dira (Shannon, Simpson, Pielou, etab.) Gainera, periodo bakoitzean zooplankton komunitatearekiko antzekotasuna (β dibertsitatea) ezarriko da estuario bakoitzeko gazitasun-guneen artean zein estuarioen artean. Analisi hauek egiteko Primer v6-Permanova+ softwarea erabiliko da.

5.2. Nitxo ekologikoen zehazpena

Bi estuarioetako espezie desberdinen nitxo ekologikoak zehazteko, OMI (Outlying mean index) izeneko metodoa erabiliko da (Dolédec et al., 2000), R programaren ade4 paketearen eskuragarri dagoena. Metodo hau marjinaltasun-irizpidean oinarrituta dago, eta espezie batek erabilitako habitataren batez besteko baldintzen eta ikerketa-eremu osoko habitataren batez besteko baldintzen arteko distantzia neurtzen du. Horrela, espeziearen gaineko eragin gehien duen ingurune-aldagaia zehaztea ahalbidetzen du. Horien emaitzak laborategi-esperimentuen bitartez kontrolpeko inguruetan aztergai diren espezieen oinarritzko nitxo ekologikoekin alderatuko dira. Esperimentu horietan, hainbat gazitasun eta tenperatura konbinaziotan (Peck et al., 2014; Svetlichny eta Hubareva, 2014), bi sexuen ale helduen biziraupenaren eta ugaltze-arrakastaren (ekoizpen-tasen eta arrautzen eklosioaren) analisien bidez termohalino-optimoak zehazteko.

5.3. Euskal kostaldeko estuarioetan hedapena

Euskal kostaldeko gainontzeko estuarioetan BEDE-en presentzia eta banaketa zehazteko, Bizkaiko (Plentzian) eta Gipuzkoako (Deba, Orio eta Bidasoan) 4 estuarioetan laginketa osagarriak egingo dira, espezie horien dentsitate-maximoak gertatzen direnean, uda eta udazken sasoietan, hain zuzen. Kasu honetan ere Bilboko eta Urdaibaiko estuarioetan egiten den prozedura berbera gauzatuko da.

6. Erreferentziak

- Ajeel, S. G. (2017), Zooplankton of Iraqi marine water north west Arabian Gulf, *International journal of marine science*, 7(8), 67-75.
- Aravena, G., F. Villate, I. Uriarte, A. Iriarte eta B. Ibañez. (2009), Response of *Acartia* populations to environmental variability and effects of invasive congeners in the estuary of Bilbao, Bay of Biscay, *Estuarine, coastal and shelf science*, 83, 621-628.
- Azeitero, U. M., S. C. Marques, L. M. R. Vieira, M. R. D. Pastorinho, P. A. B. Ré, M. J. Pereira eta F. M. R. Morgado. (2005), Dynamic of the *Acartia* genus (Calanoida: Copepoda) in a temperate shallow estuary (the Mondego estuary) on the western coast of Portugal, *Acta adriatica*, 46(1), 7-20.
- Bandpei, M. A., M. Rowshan Tabari, M. El-Sayed Abdel Fatah, N. Khodaparast eta H. Nasrolahzadeh. (2017), Abundance and biomass of the invasive copepod, *Acartia tonsa* Dana, 1849 around the fish cage culture in the southern Caspian Sea (Mazandaran-Kelardab), Iran, *Advances in Agricultural Science*, 5(4), 1-12.
- Barbier, E. B., S. D. Hacker, C. Kennedy, E. W. Koch, A. C. Stier eta B. R. Silliman. (2011), The value of estuarine and coastal ecosystem services, *Ecological Monographs*, 81(2), 169-193.
- Belmonte, G. eta D. Potenza. (2001), Biogeography of the family Acartiidae (Calanoida) in the Ponto-Mediterranean Province, *Hydrobiologia*, 453/454, 171-176.
- Cornils, A. eta B. Wend-Heckmann. (2015), First report of the planktonic copepod *Oithona davisae* in the northern wadden sea (north sea): Evidence for recent invasion? *Helgoland Marine Research*, 69(2), 243-248.
- David, V., B. Sautour eta P. Chardy. (2007), Successful colonization of the calanoid copepod *Acartia tonsa* in the oligo-mesohaline area of the Gironde estuary (SW France) Natural or anthropogenic forcing?, *Estuarine, coastal and shelf science*, 71, 429-442.

- Doledec, S., D. Chessel eta C. Gilmore-Carpentier. (2000), Niche separation in community analysis: A new method, *Ecology*, 81(10), 2914-2927.
- Frisch, D., H. Rodríguez-Pérez eta A. J. Green. (2006), Invasion of artificial ponds in Doñana natural park, southwest Spain, by an exotic estuarine copepod, *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*, 16(5), 483-492.
- Gubanov, A., D. Altukhov, K. Stefanova, E. Arashkevich, L. Kamburska, I. Prusova, L. Svetlichny, F. Timofte eta Z. Uysal. (2014), Species composition of black sea marine planktonic copepods, *Journal of Marine Systems*, 135, 44-52.
- Jeffrey, S. W., M. Vesik eta R. F. Mantoura. (1997), Phytoplankton pigments: windows into the pastures of the sea, *Nature and resources*, 33(2), 14-29.
- Katsanevakis, S., I. Wallentinus, A. Zenetos, E. Leppäkoski, M. E. Çinar, B. Öztürk, M. Grabowski, D. Golani eta A. C. Cardoso. (2014), Impacts of invasive alien marine species on ecosystem services and biodiversity: a pan-European review, *Aquatic invasion*, 9(4), 391-423.
- Lucic, D., P. Mozetic, J. Francé, P. Lucic eta L. Lipej. (2015), Additional record of the non-indigenous copepod *Pseudodiaptomus marinus* (Sato, 1913) in the Adriatic Sea, *Acta Adriat*, 56(2), 275-282.
- Pantel, J. H., D. A. Bohan, V. Calcagno, P. David, P. F. Duyck, S. Kamenova, N. Loeuille, G. Mollot, T. N. Romanuk, E. Thébault, P. Tixier eta F. Massol. (2017), 14 Questions for invasion in ecological networks, *Advances in Ecological Research*, 56, 293-340.
- Peck, N., J. Peters, R. Diekmann, S. Laakmann eta J. Renz. (2014), Interactive effects of temperature and salinity on population dynamics of the calanoid copepod *Acartia tonsa*, *Journal of Plankton Research*, 37(1), 197-210.
- Sabia, L., G. Zagami, M. G. Mazzocchi, E. Zambianchi eta M. Uttieri. (2015), Spreading factors of a globally invading coastal copepod, *Mediterranean. Marine Science*, 16(2), 460-471.
- Svetlichny, L. eta E. Hubareva. (2014), Salinity tolerance of alien copepods *Acartia tonsa* and *Oithona davisae* in the black sea, *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 461, 201-208.
- Vilà, M., C. Basnou, P. Pysek, M. Josefsson, P. Genovesi, S. Gollasch, W. Nentwing, S. Olenin, A. Roques, D. Roy, P. E. Hulme eta DAISIE (2010), How well do we understand the impacts of alien species on ecosystem services? A pan-European, cross-taxa assessment, *Frontiers in Ecology and the Environment*, 8(3), 135-144.
- Vogt, R. A., T. R. Ignoffo, L. J. Sullivan, J. Herndon, J. H. Stillman eta W. J. Kimmerer. (2013), Feeding capabilities and limitations in the nauplii of two pelagic estuarine copepods, *Pseudodiaptomus marinus* and *Oithona davisae*, *Limnology and Oceanography*, 58(6), 2145-2157.
- Williams, S. L. eta E. D. Grosholz. (2008), The invasive species challenge in estuarine and coastal environments: marrying management and science, *Estuaries and Coasts*, 31, 3-20.
- Yildiz, I., A. M. Feyzioğlu eta S. Besiktepe. (2016), First observation and seasonal dynamics of the new invasive planktonic copepod *Oithona davisae* Ferrari and Orsi, 1984 along the southern Black Sea (Anatolian Coast), *Journal of Natural History*, 51, 127-139.
- Zenetos, A., S. Gofas, C. Morris, A. Rosso, D. Violanti, J. E. García Raso, M. E. Çinar, A. Almogi Labin, A. S. Ates, E. Azzuro, E. Ballesteros, C. N. Bianchi, M. Bilecenoglu, M. C. Gambi, A. Giangrande, C. Gravili, O. Hyams-Kaphzan, V. Karachle, S. Katsanevakis, L. Lipej, F. Mastrototaro, F. Mineur, M. A. Pancucci-Papadopoulou, A. Ramos Esplá, C. Salas, G. San Martín, A. Sfriso, N. Streftaris eta M. Verlaque. (2012), Alien species in the Mediterranean Sea by 2012. A contribution to the application of European Union's Marine Strategy Framework Directive (MSFD). Part 2. Introduction trends and pathways, *Mediterranean Marine Science*, 13, 328-352.

7. Eskerrak eta oharrak

Eskerrak eman nahi dizkiegu jarraipen-programa honetan parte hartu duten langile eta ikasle guztiei. Espainiako Ekonomia eta Lehiakortasun ministerioak (CGL2013-47607-R), Eusko Jaurlaritzak (IT-778-13 GIC12/03 eta IT354-10 GIC10/168) eta Euskal Herriko Unibertsitateak (UPV/EHU) (UFI11/37) finantzatu dute Bilbo eta Urdaibai estuarioetako jarraipen-programa, ikerketa honetan erabilitako datuak erabili baitira. Euskal Herriko Unibertsitateak (UPV/EHU) finantzatu du Ziortza Barroeta Legarretaren tesia eta Plentziako Itsas Estazioak (PIE) laborategiko esperimentuak aurrera eramateko lekua esleituko du.

Bizkaiko Golkoko antxoaren energia-baliabideak: populazioaren dinamikan eragiten duten prozesu nagusietan dituzten ondorioak

Txurruka, Estibalitz¹; Cotano, Unai² eta Villate, Fernando¹

¹Landareen Biologia eta Ekologia Saila, Zientzia eta Teknologia Fakultatea, Euskal Herriko Unibertsitatea UPV/EHU, ²AZTI-Teknalia, Pasaia

estibalitz.txurruka@ehu.eus

Laburpena

Antxoa gure ekonomian garrantzia handia duen espeziea da. Bere populazioaren dinamikan eragin zuzena duten faktoreak kontutan ez hartzeagatik eta gehiegizko arrantzaren ondorioz, bere arrantza debekatu behar izan zen 2005-2010 urte bitartean. Populazioaren gainbehera hori berriz gertatu ez dadin, garrantzitsua da urtean zehar populazioak jasaten dituen aldaketak behatzea. Hipotesia aldaketa horietan antxoek erreserba moduan dituzten baliabide energetikoek eragina izango dutela da, batik bat, ugalketa garaian eta neguan. Erreserba horietan eragiten duten faktoreak, hala nola adina, sexua, urteko sasoia, latitudea eta kostaldearekiko distantzia, aztertu dira. Lortutako emaitzak, arrantzatuta daitekeen antxoaren stocka estimatzeko baliagarriak izan daitezke.

Hitz gakoak: antxoa, arrantza, *Engraulis encrasicolus*, erreserba energia, sexua, adina

Abstract

Anchovy fisheries are a relevant source of income for the Basque Country economy. Due to their mishandling and overexploitation, not taking into account the main drivers of their population dynamics, these fisheries came to a closure between the years 2005 and 2010. A way not to repeat that situation is to assess and improve our knowledge on the changes this species populations undergo during their annual cycle, for which their energy reserves are a determining factor, especially in reproductive and overwintering phases. The main objective of this work was to analyze those factors known to affect anchovies' energy reserves, focusing on age, sex, season of the year, latitude and the distance to the coast. Our results aimed to be a helpful tool to try to estimate anchovy stocks.

Keywords: anchovy, fisheries, Engraulis encrasicolus, energy reserves, sex, age

1. Sarrera eta motibazioa

Gaur egungo arrantza-sektorean nagusiki 2 faktore hartzen dira kontutan: errentagarritasuna eta jasagarritasuna. Errentagarritasunak balio ekonomiko altuko ustiatutako espezieei (atuna, antxoa...) egiten dio erreferentzia. Prezioen (gastuak eta irabaziak bere barnean hartzen dituen kontzeptua) aldakortasuna dela-eta, epe laburrean eragiten duen faktorea da. Jasagarritasuna, aldiz, populazioaren tamainak jasan ditzakeen galerei aurre egiteko gaitasuna da. Azken faktore hau ez bada kontutan hartzen, populazioaren kolapsoa gerta daiteke gehiegizko arrantzaren ondorioz, oraintsu antxoarekin gertatu den moduan (2005etik 2010era antxoaren arrantza debekatu egin zen, populazioa espeziearen biziraupenerako kopuru minimoaren azpiko balioetan baitzegoen).

Arrain-stock bat, arrantza-zientzietan, arrantza kudeatzaileentzat intereseko zenbait ezaugarri definigarriak dituen arrain-espezie jakin baten azpipopulazioa da. Stock baten (kasu honetan antxoaren stocka) populazioaren dinamikan eragiten duten faktore garrantzitsu moduan honako hiru hauek dira kontutan hartzen direnak: hazkuntza, erreklutamendua eta hilkortasun-tasa (naturala zein arrantzaren ondoriozkoa). Halaber, populazioaren dinamikan, energia-erreserbak ere garrantzi handia du, bereziki ugalketa-sasoian eta neguan zehar. Izan ere, arrain batentzat, bi sasoi horiek dira energia-gastu handiena eskatzen dutenak. Beraz, energia-erreserba nahikorik ez izatekotan, ezin izango diote egoera horiei berme nahikorekin aurre egin.

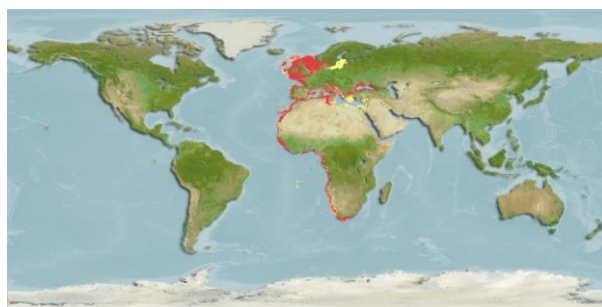
Ikerketa hau abiatzeko motibazioa, antxoaren kudeaketarako baliagarria den informazioa emendatzea da, orain arte ikertu gabe edo gutxi ikertuak izan diren aspektuak kontutan hartuz. Honela, antxoaren energia-erreserbetan eragiten duten aldagaiak aztertu nahi dira.

2. Arloko egoera eta ikerketaren helburuak

2.1. Aurrekariak

Antxoa bizi laburreko arrain-espeziea da, 5 urte inguru bizi dena. Bere banaketa zabala dela-eta (1. irudia) ugalketa-sasoi zabala duen arrin (apiriletik urrira arte), Bizkaiko Golkoan apirila eta abuztua bitartekoa da aipaturiko ugalketa-sasoi hori; errutaldiaren maximoa maiatza eta ekainean ematen da (Sanz eta Uriarte, 1989; Motos et al., 1996). Ugalketa-sasoitik kanpo, gonadak ia desagertzeraino murrizten dira, hari moduko bat izatera pasatuz. Errun ostean, arrautzen eklosioa 2-4 eguneko tartean gertatzen da (Motos et al., 1996) eta larben garapenak 30-40 egunetan ematen da (Irigoi en et al., 2007). Gazteak, jaio eta hurrengo urteko urtariletik aurrera, helduak izatera iristen dira (urtebetea betetakoa) eta orduan sartzen dira arrantza stockaren parte izatera.

1. irudia. *Engraulis encrasicolus* antxoaren banaketa



Antxoaren populazio-dinamika nagusiki erreklutamenduaren mendekoa da, hots, ale helduen multzora urtero gehitzen diren ale berrien kopuruaren mendekoa. Ale helduen multzoak duen tamainaren eta urteko belaunaldi berriaren tamainaren artean erlazio argirik ez egoteak nabarmen uzten du antxoaren kasuan inguruneak fase goiztiarraren hazkunde eta biziraupenean eragin handia duela, eta, ondorioz, hilkortasunarekin batera, urteko erreklutamendua eta populazio-dinamika erregulatzen dituela (Baali et al., 2018).

Azken urteotan zenbait ikerketatan eta gaia ikuspegi desberdinetatik aztertuta, ahaleginak egin dira ulertzeko zeintzu faktorek kontrolatzen duten espezie honen erreklutamendua Bizkaiko Golkoan (Aldanondo et al., 2010; Allain et al., 2003, 2007; Borja et al., 1996, 1998; Cotano et al., 2008; Irigoien et al., 2007, 2008). Hala ere, galdera asko geratzen da erantzuteke, garapen-fase goiztiarren (arrautzak, larbak eta gazteak) hilkortasunarekin zerikusia dutenak batik bat. Aldanondok (2010) jakinarazi zuen, ezen errutaldiari berari atxikitako hilkortasuna (arrautzena eta larba goiztiarra) eta, halaber, aleen neguko hilkortasuna izan zitezkeela urteko erreklutamenduan eragin handiena izan zezaketen faktoreetariko bi.

Errutaldiari berari atxikitako hilkortasunari dagokionez, zenbait autorek frogatu dute ezen, orokorrean, denboran zehar luzatzen diren errutalziek larbei euren elikadura, garapena eta biziraupenerako aproposenak diren habitatak aurkitzeko probabilitateak emendatzen dizkietela (James et al., 2003). Hori ez da, baina, antxoaren kasua, espezie honek denboran aski mugatuta dagoen errutaldia baitu (Motos et al., 1996). Alabaina, populazioaren adin desberdineko aleen errute-estrategiak larben biziraupena emendatzeko moldapen gisa har daitezke, adin bakoitzari dagozkion errute-garaia eta errute-tokia aldatu egiten baitira (Aldanondo et al., 2016).

Tamaina handiko antxoek txikiek baino abantaila handiagoak dituzte janaria lortzerako orduan, tamaina tarte handiago batean predatu bait dezakete, txikiek baino bizkorrago egin dezakete igeri, ez dituzte hainbeste predatzaile izango, etab. Horrek, eskuratu dezaketen energian du eragina, tamaina handikoek, txikiek baino energia gehiago lortu bait dezakete. Beraz, antxoa eme handiek, txikiek baino energia gehiago eskuratu dezakete, eta ondorioz, oozito gehiago eta bizkorrago ekoiztu ditzakete, arrautza gehiago jarritz guztira (Domínguez-Petit eta Saborito-Rey, 2010). Hau honela, populazioaren tamaina aztertzerakoan, kontutan izan beharko da arestian aipatutakoa.

Antxoa gazteen neguko hilkortasunari dagokionez, bizi-zikloko alderdi aski ezezaguna da, nahiz eta jakin udazkenetik hurrengo udaberri bitartean (sasoi horretan ale helduak erruten hasten dira berriz ere, eta ale gazteek dagoeneko ale helduen multzoarekin bat egin dute) urtez urte

aldatzen den hilkortasuna egon ba dagoela, ale ugalkorren kopurua delarik, azken finean, populazioaren tamaina erregulatzen duena.

Unean-uneke zereginetan erabiltzeko, hala nola hazkuntzarako, ugalketarako, etorkizunean erabilgarria izan daitekeen gordekin-substantzia bezala metatzeko, eta abarretarako antxoek eskuragarri eduki behar duten energia moduan definitzen baditugu energia-baliabideak, arestian aipatutako prozesu bi horietan antxoaren energia-baliabideek erabateko garrantzia izango dute. Hortaz, ikuspegi energetiko batetik kontuan hartuko dira, hain zuzen ere, hazkuntza, garapena eta ugalketarekin zerikusirik duten funtzioak.

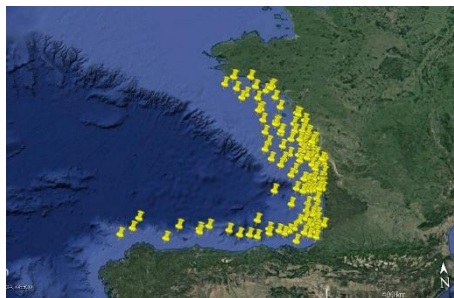
2.2. Ikerketaren helburuak

Ikerketa honen helburua, antxoaren energia-erreserbetan eragiten duten aldagaiak aztertzea da. Horretarako, antxoak Bizkaiko Golkoan maiatzean (ugalketa sasoiari) eta irailean (neguaren aurreko sasoiari) arrantzatu ziren AZTI-Tecnaliaren laguntzaz, eta diseekzionatzerakoan banatutako 3 organoen (muskulua (erreserba organo nagusia), gonada (soilik ugalketa sasoiari garatzen den organoa) eta gibela (aurreko bi organoen arteko lotura organoa)) analisi biokimikoak egin ziren.

3. Ikerketaren muina

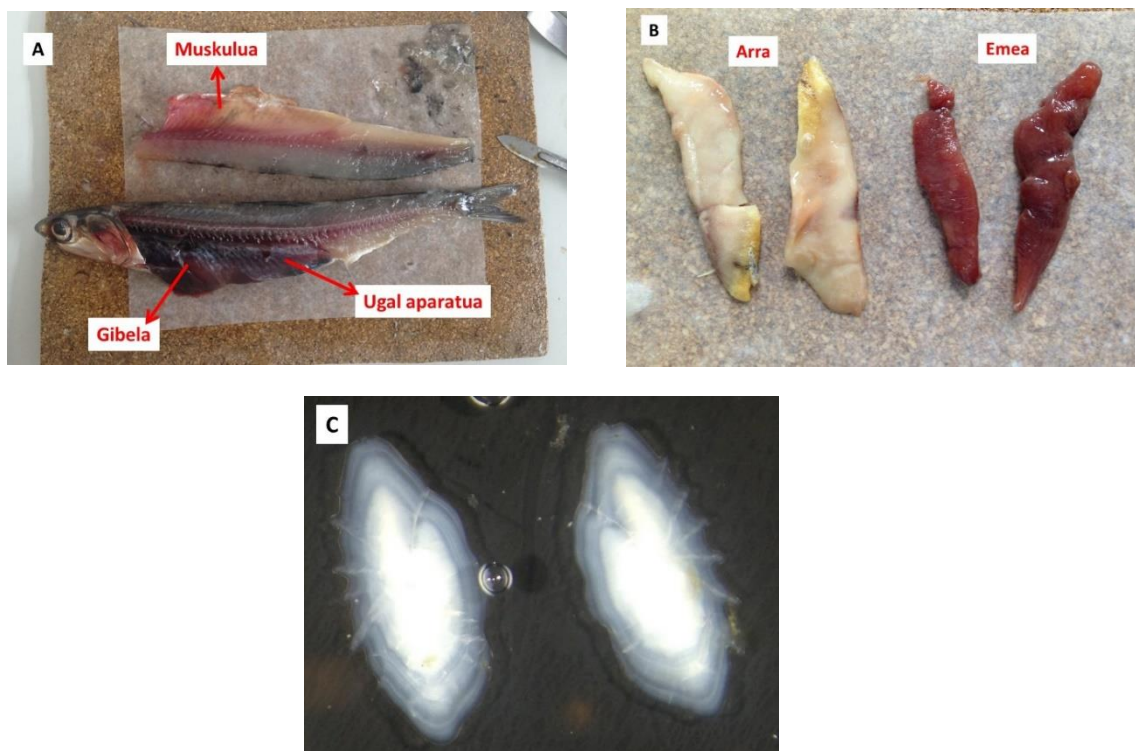
Ikerketa honetarako antxoaren 3 organo aztertu ziren (muskulua, gibela eta gonadak); beren eduki energetikoa kalkulatu ahal izateko, analisi biokimikoak egin ziren, eta proteina, lipido eta karbohidrato totalak kuantifikatu. Ondoren, beraiei baliokide energetikoak erabiliz, organo bakoitzaren energia-edukia kalkulatu ahal izan zen, horrela, antxoaren energia totala lortuz.

2. irudia. Laginketa puntuak agertzen direneko mapa



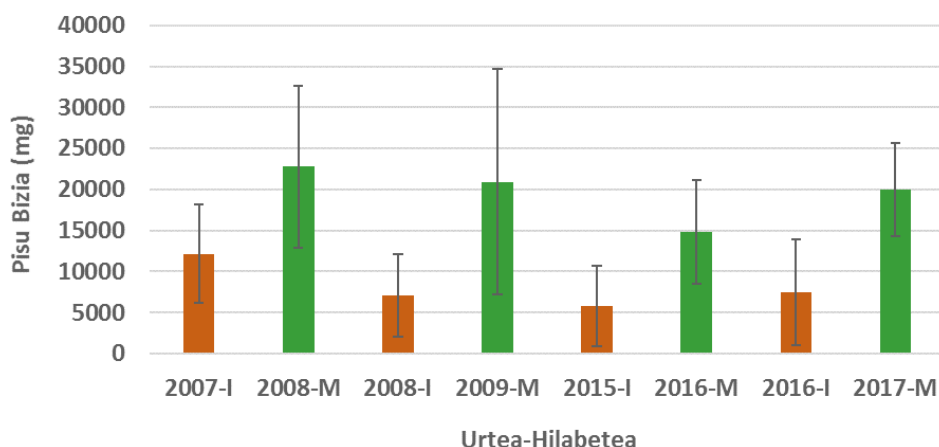
Beharrezko antxoak arrantzatu ostean (2. irudia), eta berehala izoztu ziren eta honela mantendu ziren diseekzionatuak izan arte. Diseekzioak egiterakoan, arestian aipatutako 3 organoak bereizi ziren eta, aldi berean, baita otolitoak atera ere, antxoaren adina jakiteko (3. irudia). Organoak liofilizatu eta homogeneizatu ondoren, analizatuak izan ziren. Proteinak kuantifikatzeko, Lowry et al.-en (1951) metodoa erabili zen. Lipidoetan, bi erauzketa egin ziren: Bligh eta Dyer-ena (1959) lehendabizi eta Folch et al.-ena (1956) bigarrenik. Erauzitako lipidoen kuantifikazioa Marsh eta Weinstein-en (1966) metodoaren bidez egin zen. Azkenik, karbohidratoak triklorazetiko (TKA) berotan erauzi ziren eta kuantifikazioa Dubois et al.-en (1956) metodoaren bidez egin zen. Behin proteina, lipido eta karbohidrato totalak izanda, euren baliokide energetikoa aplikatu zitzaizen (23.64 J/mg, 36.067 J/mg, 17.155 J/mg hurrenez hurren) energia totala lortzeko.

3. irudia. Disekzioan bereiztutako 3 organoak (A); antxoa arraren eta emearen maiatzeko gonaden arteko desberdintasuna (B); otolitoak luparen bitartez ikusia (C), adin eratzunak ikusteko.



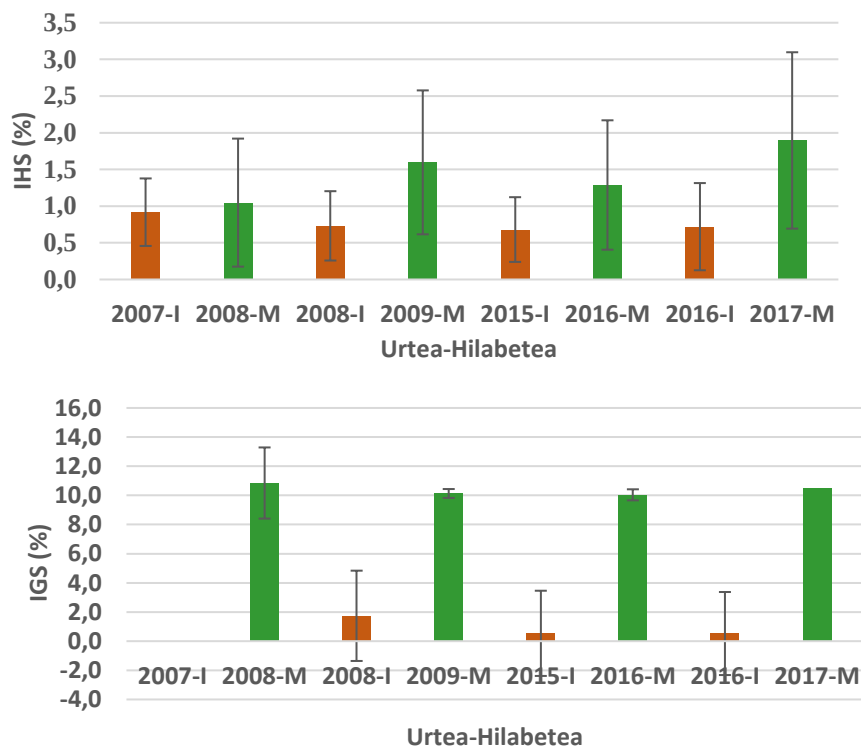
Lortutako datu guztiekin datu-base bat antolatu zen eta desberdintasunik zegoen edo ez behatu. Desberdintasunak agertzen ziren kasuan, esangarriak ziren edo ez jakiteko ANOVA eta Student-en t-testa (soilik bi multzo genituenean konparatzeko) egin ziren

4. irudia. Urte eta hilabete desberdinetako pisu biziak (mg) eta euren errore estandarrak. I = Iraila, M = Maiatza, marroiz irailak eta berdez maiatzak.



Lagin guztiak urte eta hilabeteetan bereiztean (4. irudia), antxoa txikienak irailetan aurkitu ziren ($p < 0,001$, $F = 366.11$, $df = 7$), hilabete honetan urte horretako gazteak ere aurkitzen baitira, eta maiatzetan, aldiz, helduak soilik (Aldanondo et al., 2010). Era berean, maiatzetan zentratuz, 2016ko maiatzeko antxoak gainerakoenak baino esangarriki txikiagoak zirela ikusi zen ($p < 0,001$, $F = 49.662$, $df = 3$). Urtez urte populazioko ale helduak nahiko konstante mantentzen ohi den bitartean, urte horretako ale gazteek gorabehera handiak jasan ditzake (Lapolla, 2001). Beraz, populazioaren batezbesteko pisuan eragin handiena duena, ale gazteen ugaritasun erlatiboa izaten da.

5. irudia. Urte eta hilabete desberdinetako Indize Hepatosomatikoa (IHS (%)) eta Indize Gonadosomatikoa (IGS (%)) eta euren errore estandarrek. I = Iraila, M = Maiatza, marroiz irailak eta berdez maiatzak.

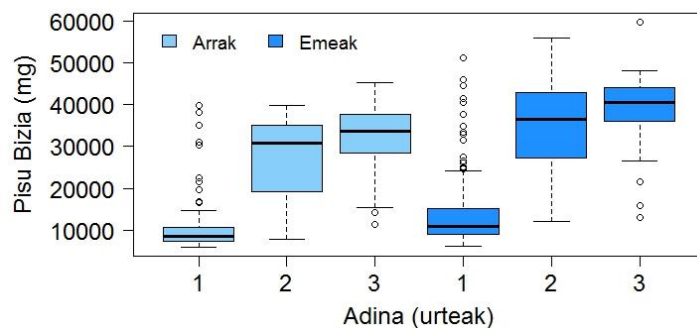


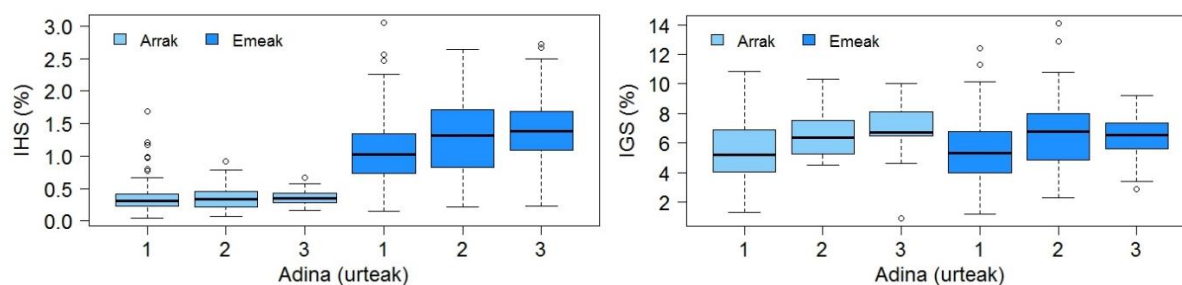
Lagin guztien IHSak eta IGSak urte eta hilabeteetan bereiztean (5. irudia), indize txikienak bi kasuetan irailetan aurkitu ziren (IHS: $p < 0,001$, $F = 159,29$, $df = 7$; IGS: $p < 0,001$, $F = 1064,2$, $df = 6$). Arreta IGS-an jartzen badugu, maiatzekoak esangarriki askoz ere handiagoak ziren ($p < 0,001$, $t = 77,583$, $df = 2165$) irailakoak baino.

3.1. Adina eta sexua kontutan hartuta

Urte bakoitzerako lortutako datuak, besteak beste, adinaren eta sexuaren arabera bereizi ziren (6. irudia).

6. irudia. Adibidea: 2009ko maiatzeko antxoen Pisu Bizia (mg), Indize Hepatosomatikoa (IHS) (%) eta Indize Gonadosomatikoa (IGS) (%) adinaren eta sexuaren arabera bereiztuta.

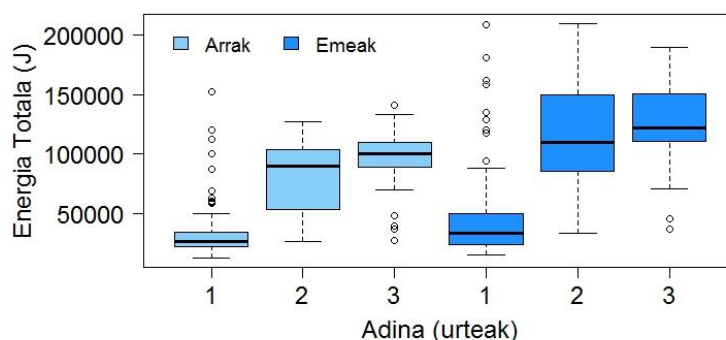




Antxoen pisu biziaren artean desberdintasunak nabariak ziren ($p < 0.001$, $t = -4.7862$, $df = 482$) eme eta arren artean. Era beran, emeek arrek baino IHS handiagoa zuten kasu guztietan ($p < 0.001$, $t = -16.659$, $df = 448$). Halaber, arren IGSa adinarekin emendatzen zihoan heinean ($p < 0.001$, $F = 7.968$, $df = 2$), emeen kausan, soilik 1 urtekoak ziren desberdintasunak zituztenak ($p < 0.05$, $F = 11.309$, $df = 2$). Ugalketa garaian emeek IHS handiagoa izatea arrek baino, gonadaren garapenean arren gibel eta muskuluak ez dutela parte hartzen iradokitzen dute (Pérez et al., 2007).

Energia totalen ere (7. irudia), desberdintasunak esangarriak ziren bai sexuen artean ($p < 0.05$) bai eta adinen artean ere ($p < 0.001$). Honela, 1 urtekoek besteek baino energia gutxiago zutela ikusteaz gain, arrek emeek baino energia gutxiago zutela ikus zitekeen ($p < 0.05$). Izan ere, arrek ez dute emeek haina energia inbertitu behar (Espínola et al., 2014; Kaçar eta Başhan, 2015) (Tirelli et al., 2006). Emaizta hauek, beste ikerketa batzuekin egiten dute bat (Birkeland eta Dayton, 2005; Nunes et al., 2011; Domínguez-Petit eta Saborido-Rey, 2010).

7. irudia. Adibidea: 2009ko maiatzeko antxoen energia totala (J), adina eta sexua bereizirik.



4. Ondorioak

Sasoi desberdinetako antxoen pisu biziaren desberdintasunak, gazte-kopuruarekin erlazonaturik daude. Izan ere, irailean, urte horretan jaiotako antxoak daude. Hori dela-eta, populazioaren batz besteko pisuaren balioa txikiagoa da. Bestetik, maiatzean, ez dago gazterik, aurreko urtean jaiotako antxoak dagoeneko, urtariletik aurrera, heldu (1 urte) izatera iritsi baitira. Eta bestetik, negua gainditzeko gai izan ez diren antxoarik ez dago. Beraz, antxoen batz besteko pisuak altuagoak dira.

Sexuaren eta adinaren arteko behin-behineko analisiek iradokitzen dute, esperotako moduan, ugalketa-sasoian emeek arrek baino energia gehiago dutela. Izan ere, emeek, arrautza bihurtuko diren obuluetan inbertitutako energia, arrena baino handiagoa da, emeek larbek elikagai gisa erabiliko duten biteloa sortu behar baitute.

Bestetik, 1 urtekoen metaketa energetikoa (eta ondorioz, errutaldian egin dezaketen gastu energetikoa), gainerako urteetako (antxo zaharragoena alegia) baino baxuagoa izanik, ale bakoitzak errundako arrautza-kopurua antxo zaharragoek errundakoen berdina izango balitz, arrautzak txikiagoak izango ziren. Hortaz, 1 urtekoek jarritako arrautzetatik irtendako larben bizi-iraupena, beste adinekoek jarritako arrautzetatik irtendako larbena baino txikiagoa izan daitekeela pentsa daiteke. Alternatiboki, 1 urtekoen arrautza-tamaina antxo zaharragoen berdina izango balitz, ezinbestean kohorte horrek errundako arrautza-kopurua txikiagoa izango litzateke.

Gainera, 1 urtekoen ugalkortasuna proportzionalki zaharragoena baino txikiagoa da, ugalketa-sasoi laburragoa daukate eta errute maiztasuna ere txikiagoa da. Bata dela edo bestea dela, gazteen erreklutamenduan edo beste modu batera esanda, hurrengo urtean helduak izango diren antxoa-kopuruan, garrantzia handiagoa izango dute 2 urtetik gorakoek jarritako arrautzetatik irtendako larbek (energia gehiago izanik eskuragarri, bizi-irauteko aukera gehiago izan dutelako, edo besterik gabe, jaiotzean gehiago zirelako).

Beraz, populazioaren tamaina aztertzerako orduan, eta ondorioz, arrantza daitezkeen ale kopuruak estimatzerako orduan, antxoa zaharragoen ekarpen handiagoa kontutan izan beharko da, hauen kopuru minimo bat mantentzen saiatuz.

5. Etorkizunerako planteatzen den norabidea

Sexuak eta adinak duten eragina ikusita, urteko sasoiak (udaberria eta udazkena, ugalketa-sasoia eta negu aurreko sasoiak hurrenez hurren), latitudeak eta kostaldearekiko distantziak eraginik duten edo ez aztertuko da. Analisi estatistikoak ANOVA bidez egingo dira baita, R erabiliz.

Era berean, 2017ko antxoen kasuan, antxoek eskuragarri duten energiaren hilabeteko behaketa egingo da, hilabete bakoitzean duten energia totala kalkulatz. Honela, antxoaren bizi-zikloko 2 sasoi garrantzitsuenek (negua igarotzea eta ugalketa) ze eragin duten jakin dezakegu. Hots, iraileko datuak hurrengo urteko martxoko datuekin erkatzen baditugu, negua igarotzeko antxoak gastatutako energia kopurua estima dezakegu. Era berean, martxoko datuak, apirileko eta maiatzeko datuekin erkatzen baditugu, antxoak ugalketarako metatuko duen energia-kopurua (apirilean) eta ugalketan gastatzen hasitakoa (maiatzean) estima dezakegu.

Arrantzaren ikuspuntutik, garrantzitsua da hurrengo urtean zenbat antxoa egongo den ahalik eta zehazkien estimatzea eta, baita, arrantza-sasoia hasi aurretik zenbat antxoa dagoen itsasoan eta nolako egoera fisiologikotan dauden jakitea. Hori dela-eta, arestian aipatutako antxoen neguko energia-gastua ezagutzea oso baliagarria izango litzateke. Izan ere, negua hasi aurretik beharrezko energiaren gutxieneko maila gainditzen ez duten antxoen hilkortasun-tasa jakin ahal izango litzateke. Honela, gaur egungo kuoten kalkuluetan erabilitako formulei aldagai berri bat gehitzean, kuoten kalkulu horiek hobetzea ekar dezakeen.

6. Erreferentziak

- Aldanondo, N. (2010), Young-of-the-year European anchovy in the Bay of Biscay. Study of recruitment determining processes based on otolith microstructure analysis. UPV/EHU, 181 pp.
- Aldanondo, N., Cotano, U., Tiepolo, M., Boyra, G. eta Irigoien, X. (2010), Growth and movement patterns of early juvenile European anchovy (*Engraulis encrasicolus* L.) in the Bay of Biscay based on otolith microstructure and chemistry. *Fisheries Oceanography*, 19 (3): 196-208.
- Aldanondo, N., Cotano, U., Goikoetxea, N., Boyra, G., Ibaibarriaga, L. eta Irigoien, X. (2016), Interannual differences in growth and hatch-day distributions of early juvenile European anchovy in the Bay of Biscay: implications for recruitment. *Fisheries Oceanography*, 25 (2): 147-163.
- Allain G., Petitgas, P., Grellier, P. eta Lazure, P. (2003), The selection process from larval to juvenile stages of anchovy (*Engraulis encrasicolus*) in the Bay of Biscay investigated by Lagrangian simulations and comparative otolith growth. *Fisheries Oceanography*, 12: 407-418.
- Baali, A., Bourassi, H., Falah, S., Abderrazik, W., El Qoraychy, I., Amenzoui, K. eta Yahyaoui, A. (2018), Study of reproduction of anchovy *Engraulis encrasicolus* (Actinopterygii, Engraulidae) in the central area of the Moroccan Atlantic coast. *Journal of Materials and Environmental Sciences*, 8 (12): 4467-4474.
- Birkeland, C. eta Dayton, P.K. (2005), The importance in fishery management of leaving the big ones. *TRENDS in Ecology and Evolution*, 20 (7): 356-358.
- Bligh, E.G. eta Dyer, W.J. (1959), A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 37: 911-917.
- Borja, A., Uriarte, A., Valencia, V., Motos, L. eta Uriarte, A. (1996), Relationships between anchovy (*Engraulis encrasicolus* L.) recruitment and the environment in the Bay of Biscay. *Scientia Marina*, 60 (Supl. 2): 179-192.

- Borja, A., Uriarte, A., Egaña, J., Motos, L. eta Valencia, V. (1998), Relationships between anchovy (*Engraulis encrasicolus*) recruitment and the environment in the Bay of Biscay (1967-1996). *Fisheries Oceanography*, 7: 375-380.
- Domínguez-Petit, R. eta Saborido-Rey, F. (2010), New bioenergetic perspective of European hake (*Merluccius merluccius* L.) reproductive ecology. *Fisheries Research*, 104: 83-88.
- Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers P.A. eta Smith, F. (1956), Colorimetric method for determination of sugar and related substances. *Analytical Chemistry*, 28: 350-356.
- Espínola, L.A., Dourado, E.C. eta Benedito, E. (2014), Difference in reproduction energy content in muscle on fish from reservoirs in Paraná State, Brazil. *Neotropical Ichthyology*, 12(4): 783-794.
- Folch, J., Lees, M. eta Sloane Stanley, G.H. (1956), A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry*, 226: 497-509.
- Irigoién, X., Fiksen, O., Cotano, U., Uriarte, A., Álvarez, P., Arrizabalaga, H., Boyra, G., Santos, M., Sagarminaga, Y., Otheguy, P., Etxebeste, E., Zarauz, L., Artetxe I., eta Motos, L. (2007), Could Biscay Bay anchovy recruit through a spatial loophole? *Progress in Oceanography*, 74 (2-3): 132-148.
- Irigoién, X., Cotano, U., Boyra, G., Santos, M., Álvarez, P., Otheguy, P., Etxebeste, E., Uriarte, A., Ferrer, L. eta Ibaibarriaga, L. (2008), From egg to juvenile in the Bay of Biscay: spatial patterns of anchovy (*Engraulis encrasicolus*) recruitment in a non-upwelling region. *Fisheries Oceanography*, 17: 446-462.
- James, A., Pitchford, J.W. eta Brindley, J. (2003), The relationship between plankton blooms, the hatching of fish larvae and recruitment. *Ecological Modelling*, 160 (1): 77-90.
- Kaçar, S. eta Başhan, M. (2015), Seasonal Variations in the Fatty Acid Composition of Phospholipid and Triacylglycerol in Gonad and Liver of *Mastacembelus simack*. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 92: 1313-1320.
- Lapolla, A.E. (2001), Bay anchovy *Anchoa mitchilli* in Narragansett Bay, Rhode Island. I. Population structure, growth and mortality. *Marine Ecology Progress Series*, 217: 93-102.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. eta Randall, R.J. (1951), Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193: 265-275.
- Marsh, J.B. eta Weinstein, D.B. (1966), Simple charring method for determination of lipids. *Journal of Lipid Research*, 7: 574-576.
- Motos, L., Uriarte, A. eta Valencia, V. (1996), The spawning environment of the Bay of Biscay anchovy (*Engraulis encrasicolus* L.). *Scientia Marina*, 60: 117-140.
- Nunes, C., Silva, A., Marques, V. eta Ganas, K. (2011), Integración de la talla, condición y demografía poblacional en la estimación de la fecundidad anual de la sardina iberoatlántica. *Ciencias Marinas*, 37 (4B): 565-584.
- Pérez, M.J., Rodríguez, C., Cejas, J.R., Martín, M.V., Jerez, S. eta Lorenzo, A. (2007B), Lipid and fatty acid content in wild White seabream (*Diplodus sargus*) broodstock at different stages of the reproductive cycle. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 146: 187-196.
- Sanz, A. eta Uriarte, A. (1989), Reproductive cycle and batch fecundity of the Bay of Biscay anchovy, *Engraulis encrasicolus*, in 1987. *California Cooperative Oceanic Fisheries Investigations*, 30: 127-135.
- Tirelli, V., Borme, D., Tulli, F., Cigar, M., Umai S.F. eta Brandt, S.B. (2006), Energy density of anchovy *Engraulis encrasicolus* L. in the Adriatic Sea. *Journal of Fish Biology*, 68: 982-989.

7. Eskerrak eta oharrak

Eskerrak eman nahi dizkiegu lehendabizi antxoak arrantzatu dituen AZTI-Tecnalia-ko lantaldeari. AZTI-Tecnalia-ko Iñaki Ricori antxoak otolitoak erabiliz adina zehazteagatik. Baita, laborategiko lanean lagundu duten Domeka Beitia, Irati Ranero, Enara Goienechea eta Natalia Monterori. Lan hau Azti-Tecnalia eta UPV/EHU Euskal Herriko Unibertsitateak finantziatua izan da.

Ur gazte frakzioa ibai-arro mediterraneo batean: gainazaleko urak datatzeko metodologia berri baten aplikazioa (Vallcebre Ikerketa Arroak, Pirinioen HE-a).

Valiente, Maria¹; Gallart, Francesc²; Llorens, Pilar² eta Latron, Jérôme²

¹Geodinamika Saila, Zientzia eta Teknologia Fakultatea, Euskal Herriko Unibertsitatea UPV/EHU

² Instituto de Diagnóstico Ambiental y Estudios del Agua (IDAEA-CSIC), Bartzelona

maria.valiente@ehu.eus

Laburpena

Ur gazte frakzioa (F_{ug}) jarioan doan edo biltegitatuta dagoen ur masa baten 2-3 hilabete baino gazteagoa den ur proportzioa da. Informazio hau baliagarria da ibai-arro bateko gainazaleko isurketen sortze-prozesuak ulertzeko. Can Vila arro mediterraneoan (Pirinioen HE-a) lurzoruko, lurrazpiko eta erreka-ko uretan kalkulatu da F_{ug} , prezipitazioaren eta aipatutako konpartimentu hidrologiko bakoitzaren oxigeno-18 isotopoaren urtaroko zikloak alderatuz. F_{ug} handiena lurzoruko uretan topatu da. Errekako eta lurrazpiko uretan ordea, ur gazte frakzioa erreka-ko ur-emariaren eta lurrazpiko ur-mailaren arabera da, ia zerora murrizten delarik ur-emari eta ur-maila baxuetan. Ikerlan honek, arro mediterraneo batean lehen aldiz aztertutako F_{ug} balioak aurkezten ditu.

Hitz gakoak: arro-hidrologia, Vallcebre Ikerketa Arroak, isotopo egonkorak, ur gazte frakzioa.

Abstract

The young water fraction (F_{yw}) is defined as the proportion of water in a stored or flowing mass that is younger than 2-3 months. It is a useful metric for better understanding the runoff generation processes in a catchment. F_{yw} was calculated in soil, ground and stream waters at the Mediterranean catchments of Can Vila (SE Pyrenees) from the comparison of seasonal cycles of oxygen-18 isotope between precipitation and each hydrological compartment. The results show that soil waters exhibit rather large F_{yw} , while young water fractions in stream and ground waters were strongly related to discharges and water table variations, decreasing to practically zero for both low discharges and water levels. No F_{yw} values of Mediterranean catchments were available before this study.

Keywords: catchment hydrology, Vallcebre Research Catchments, stable isotopes, young water fraction.

1. Sarrera eta gaiaren gaurko egoera

Arro hidrologia, euri-urek erreka edo ibairaino iristeko egiten duten ibilbidea (gainazaleko isurketen sortze prozesuak) eta urak arro batean ematen duen denbora ikertzea helburu duen ikerketa-arloa da (McGuire eta McDonnell, 2008). Ezagutza hori ur-kudeaketa jasangarri eta eraginkor baten oinarria da, gaur egun berebiziko garrantzia duena. Izan ere, ura, ingurumen-eta gizarte-ongizatea bermatzen duen ezinbesteko baliabide mugatua da.

Craig-en (1961) lan aitzindariak geroztik, naturalki gertatzen diren uraren isotopo egonkorak, oxigeno (^{18}O) eta hidrogeno (^2H edo D [Deuterio]), arroen funtzionamendua ulertzeko tresnen artean, tresna eraginkorrenetarikoa bilakatu dira.

Arro hidrologian ^{18}O eta ^2H isotopoak aplikatzeko oinarria, prezipitazioaren konposizio isotopikoaren urtaroko bariazioa da. Euri-uraren konposizio isotopikoa baldintzatzen duten faktoreak, besteak beste, prezipitazio kopurua, tenperatura, latitudea eta altuera dira.

Zehazki, lan honetan uraren isotopo egonkorren urtaroko bariazioak arro bateko uraren igarotze-denboren ikerketan erabili dira. Igarotze-denbora, urak arro batean prezipitazio moduan sartzen denetik erreka iristeko behar duen denbora da. Arro baten deskribapena egiteko ezinbesteko neurketa da, hain zuzen ere, uraren biltegitatze, ibilbide eta iturburuei buruzko informazioa ematen baitigu (McGuire eta McDonnell, 2008).

Eskuarki, igarotze-denborak batez besteko igarotze-denbora bezala kalkulatuak izan dira (MTT, ingelesezko *mean transit time*-etik), hau da, ur molekula batek prezipitaziotik erreka igarotzeko behar duen batez besteko denbora. Hala ere, berriki argitaratutako artikulu batek

(Kirchner, 2016) isotopo egonkorren bariazioaz baliatzen ziren MTT kalkuluak oker daudela frogatu du. Izan ere, MTT kalkulatzeko metodoek arroak homogeneousak direla suposatzen dute, baina errealitatean, arro guztiak heterogeneoak dira; honek, erroreak sortzen ditu isotopo egonkorren bariazioaz baliatzen diren MTT kalkuluetan. Aldi berean, autoreak uraren adina zehaztasunez kalkulatzeko neurketa-metodo berria garatzen du: ur gazte frakzioa (F_{ug}). Ur gazte frakzioa, gainazaleko isurketan edo biltegitratuta dagoen ur masa batean 2-3 hilabete baino gazteagoa den ur proportzioa da.

F_{ug} -az baliatuz, arro bateko urak erreka edo ibairaino egiten dituen ibilbide azkarrek zenbatetsi daitezke, eta hori, garrantzi handikoa da gainazaleko isurketen sortze-prozesuak eta kutsatzaile eta mantenugaien garraioa ulertzeko. Dagoeneko, Jasechko et al.-ek (2016) metodologia berria erabili dute, munduan zeharreko ehunka arroen F_{ug} -a kalkulatzeko eta mundu-mailako ibaien uretako heren bat 2-3 hilabete baino gazteagoa dela ondorioztatu dute.

Ikerketa honen lan-eremua Vallcebre Ikerketa Arro Mediterraneoetako bat da, Can Vila arroa hain zuzen. Ikerketa-eremua IDAEA-CSIC-eko Gainazaleko Hidrologia eta Higadura taldeak kudeatzen du 1988 urtetik.

2. Ikerketaren helburuak

Can Vila arroan ur gazte frakzioaren metodologia berriaren aplikazioa da ikerketaren helburu nagusia. Horretarako, bete beharreko bigarren mailako helburuak ondorengoak dira:

- Prezipitazio-uraren (sarrerako seinalea) eta Can Vila arroaren lurzoruko, lurrazpiko eta erreka-uren (irteerako seinalea) urtaroko bariazio isotopikoen azterketa.
- Ur gazte frakzioaren kalkulua (F_{ug}) lurzoruko, lurrazpiko eta erreka-uretan. Bestalde, erreka-uretan, haztatu gabeko (ur-emariak kontuan hartu gabe) eta ur-emari balioak erabiliz haztatuko F_{ug} balioen kalkulua.
- Lurrazpiko ur-mailaren eta erreka-ur-emariaren araberrako F_{ug} balioen aldaketak balioztatzea.

Guk dakigunez hau da lehenengo aldia arro mediterraneo batean F_{ug} balioak kalkulatzeko direla. Arro mediterraneoetan ematen den ur eskasia dela eta, eta gaur eguneko Aldaketa Globala gogoan, arro horietan gainazaleko isurketen sortze-prozesuen ikerketak funtsezkoak dira ur-baliabideen kudeaketa egoki baterako.

3. Ikerketa-eremuaren deskribapena

Ikerketa Can Vila arroan gauzatua izan da. Can Vila, Vallcebre Ikerketa Arroen arroetariko bat da. Vallcebre Ikerketa Arroak Llobregat ibaiaren goiburuan kokatuta daude, Pirinioen hegoaldean (42°12' N, 1°49' E). Can Vila arroak 0,56 km²-ko azalera du eta 1458 eta 1115 m.i.g. bitarteko altuera (1. irudia). Litologiaz inpermeable hartzen den lutitazko substratu baten gainean dago kokatuta arroa. Lutiten gainean garatutako lurzorua buztin-lohitsua dira, konduktibitate hidrauliko txikikoak (konduktibitate hidraulikoa eremu harritsuek ura pasatzen uzteko duten erraztasuna neurtzen duen parametroa da). Lurzoruetan, sakonera txikiko akuifero libreak topatzen dira. Basoak, arroaren % 34 estaltzen du eta larreek % 63, zonalde txiki batzuetan substratu harritsua agertzen delarik (1. irudia). Inguruko klima mediterraneo hezea da, udan ur eskasi nabarmena duena. Urteko batez besteko tenperatura 7.3°C-koa da (1987–2006) eta batez besteko prezipitazioa 891 ± 201 mm-koa (Llorens et al., 2018).

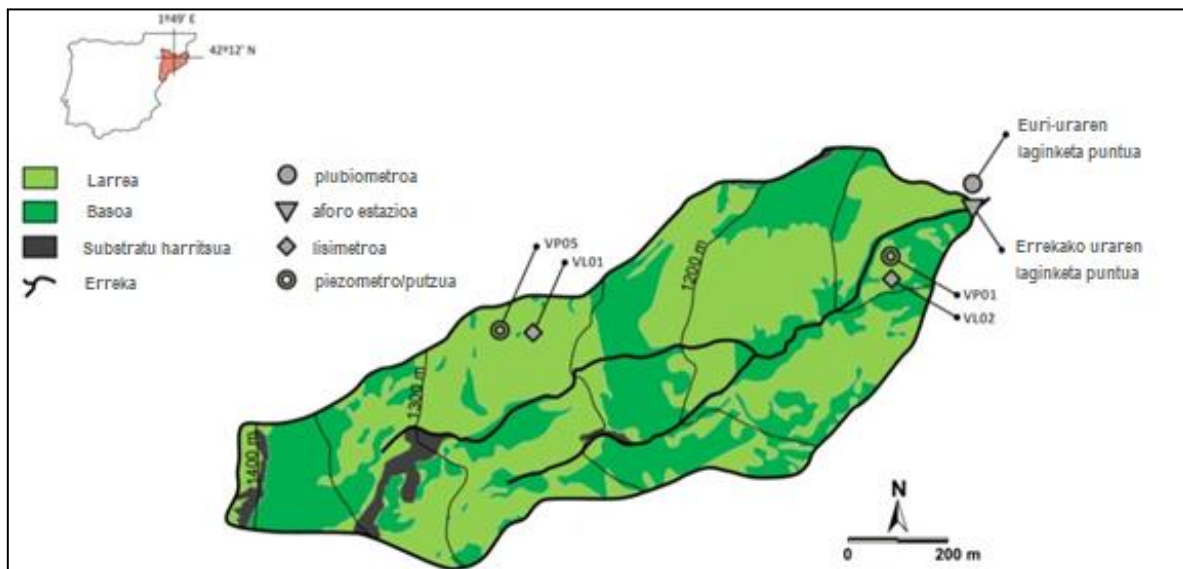
4. Ikerketaren muina

4.1. Datuen bilketa

Isotopo egonkorren analisiak egiteko laginak, lurrazpiko uretan, 4 m-ko putzu eta 2 m-ko piezometro batetik (VP01 eta VP05 puntuetan, hurrenez hurren), lurzoruko uretan, xurgatze-lisimetroekin (VL01 eta VL02 puntuetan), euri-uretan eta erreka-uretan (Can Vila azpi-arroaren irteeran) hartuak izan ziren (1. irudia). Euri-ura automatikoki lagindu zen 5 mm-ro 2011ko maiatzetik 2017ko azarora. Lurzoru eta lurrazpiko urak astero lagindu ziren 2011ko

maiatzetik 2013ko uztaileira. Errekako ur-laginketa ur-emariaren arabera izan zen; agorraldietan, astean behin lagindu zen, eta ur-gorraldietan ordea, 2-20 lagin hartu ziren goraldi bakoitzeko (goraldiaren tamainaren arabera).

1. irudia. Can Vila arroaren mapa, laginketa-puntuen kokapena erakusten duena. Roig-Planasdemunt-en lanetik (2016) moldatua.



Uraren isotopo egonkorak ($\delta^{18}\text{O}$ eta δD), Lleidako unibertsitatean analizatu ziren, Pizarro L2120-i Cavity Ring-Down espektrometria analizatzailea erabiliz. Konposizio isotopikoa δ notazioaz adierazi da (%).

Prezipitazioaren, lurzoruko, lurrazpiko eta erreka ur-laginen neurketa isotopikoak urte bateko denbora eskalan agregatu dira, hau da, urteko egun eskalan (DOY eskala: *day of year*).

4.2. Oinarri teorikoa: uraren isotopo egonkorak eta ur gazte frakzioaren kalkulua

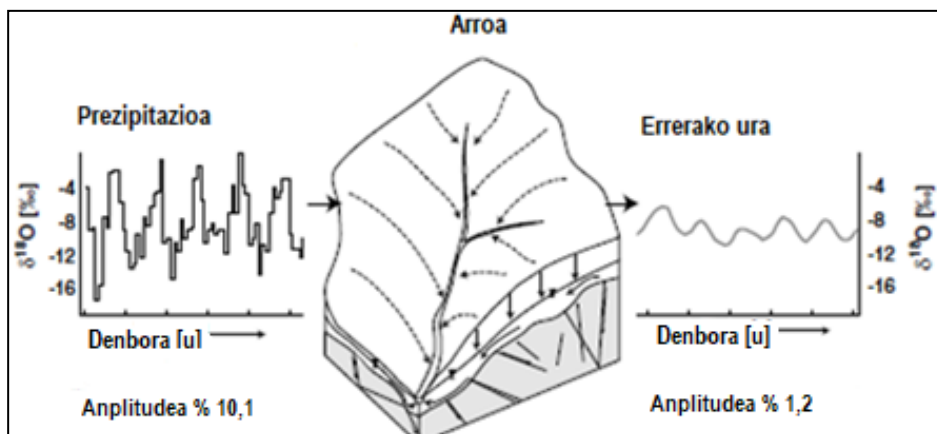
Isotopo egonkorak erradioaktiboak ez diren elementu kimiko jakin baten aldaerak dira, protoi kopuru bera eta neutroi kopuru ezberdina dutenak, masa atomiko ezberdina beraz. Oxigenoak hiru isotopo egonkor ditu (^{16}O , ^{17}O eta ^{18}O) eta hidrogenoak bi (^1H eta ^2H [edo D]). Ondorioz, ur-molekularen (H_2O) bederatzi konfigurazio isotopiko daude. Uretako oxigenoaren konposizio isotopikoa, isotopo astunaren eta arinaren arteko proportzioa bezala adierazten da ($^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$), konposizio ezaguna duen lagin estandar batekin alderatuz (Vienna Standard Mean Ocean Water [VSMOW]). Konposizio isotopikoa δ notazioaz adierazten da:

$$\delta^{18}\text{O} (\text{‰}) = \frac{^{18}\text{O}/^{16}\text{O}_{\text{lagina}}}{(^{18}\text{O}/^{16}\text{O}_{\text{VSMOW}}) - 1} \times 1000 \quad (1)$$

Uraren isotopo egonkorren konposizioa, nahasketa- eta zatiketa-prozesuen bitartez baino ez da aldatzen. Zatiketa-prozesuak, uraren molekula arinenak astunak baino errazago lurruntzen direlako ematen dira. Horrela, ur-lurruna uraren molekula arinenetan aberasten da, $\delta^{18}\text{O}$ balio negatiboagoak aurkeztuz. Alderantziz, gainerako ur likidoa isotopo astunetan aberasten da, $\delta^{18}\text{O}$ balio positiboagoak izanik. Zatiketa isotopikoaren prozesua tenperaturaren menpekoea da (McGuire eta McDonnell, 2008).

Ur gazte frakzioa kalkulatzeko erabiltzen diren metodoak prezipitazioaren isotopo egonkorren konposizioan ematen den urtaroko bariazioetan oinarritzen dira. Isotopo horiek, prezipitazioarekin batera arroan sartzen dira, eta hainbat gainazaleko eta lurrazpiko ibilbidetatik garraiatuak izaten dira drainatze-sareraino (errekaraino). Garraio-prozesuan zehar, isotopoak berandutu (adbeztioa dela eta) eta hedatu (dispertsioa dela eta) egiten dira. Garraio diferentzial horren ondorioz, isotopo egonkorren arteko seinalea leundu egiten da (anplitudea murriztu) sarrerako seinalearekin alderatuz (2. irudia). Isotopo egonkorren urtaroko zikloen leuntzea ur gazte frakzioa ondorioztatzeko erabiltzen da; sarrerako seinaleak leuntze handiagoa duen heinean, ondorioztatutako F_{ug} handiagoa da (McGuire eta McDonnell, 2006).

2. irudia. $\delta^{18}\text{O}$ isotopoaren urtaroko zikloak prezipitazioan eta erreka-ko uretan. Erreka-ko uretan urtaroko ziklo isotopikoak leunduak azaltzen dira. McGuire eta McDonnell-en lanetik (2006) moldatua.



Uhin sinusoidalaren metodoa, ur gazte frakzioa kalkulatzeko metodorik sinpleena da. Metodoa, neurtutako sarrerako (prezipitazioaren) eta irteerako (lurzoruko, lurrazpiko eta erreka-ko uretako) seinaleen isotopoen urtaroko zikloei uhin sinusoidal, edo sinusoide, bat egokitzean datza.

Prezipitazioaren eta lurzoruko, lurrazpiko eta erreka-ko uraren urtaroko ziklo isotopikoak uhin sinusoidalaren ekuazioaren bitartez adieraziak izan daitezke:

$$\delta (\text{‰}) = \beta_0 + A[\cos(ct - \varphi)] \quad (2)$$

non, β_0 (‰) $\delta^{18}\text{O}$ -ren batez besteko balioa, A (‰) ^{18}O seinalearen anplitudea, φ (rad) urtaroko zikloaren fasea, c (rad d⁻¹) maiztasun angeluarraren konstantea ($2\pi/365$) eta t (egun) denbora diren.

(2) ekuazioa estatistikoki kalkulatu izan daiteke sinu eta kosinu terminoak erabiliz:

$$\delta = \beta_0 + \beta_{\cos} \cos(ct) + \beta_{\sin} \sin(ct) \quad (3)$$

β_0 , $\beta_{\cos}$ eta $\beta_{\sin}$ koefizienteak erregresio lineal anitza erabiliz zehaztu daitezke. Azkenik, A , φ eta β_0 parametroen balioak, baita beraien ziurgabetasunak ere, horrela kalkulatu daitezke:

$$A = \sqrt{\beta_{\cos}^2 + \beta_{\sin}^2} \quad (4)$$

$$\tan \varphi = |\beta_{\sin} / \beta_{\cos}| \quad (5)$$

Kalkulu estatistikoak SPSS pakete estatistikoa erabiliz gauzatu dira.

Hortaz, 2-3 hilabete baino gazteagoa den ur frakzioa honela kalkulatu daiteke:

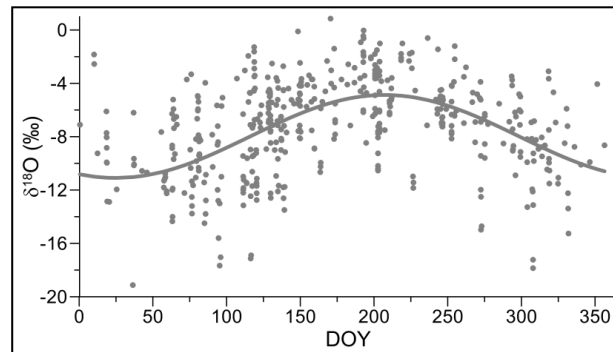
$$F_{yw} = A_i / A_s \quad (6)$$

non, A_s sarrerako seinalearen anplitudea eta A_i irteerako seinalearen anplitudea diren. Ziurgabetasunak errore hedapen Gaussianra erabiliz kalkulatu dira, eta errore estandar bezala adierazi dira (SE).

4.3. Uhin sinusoidalak eta ur gazte frakzioa Can Vila arroan

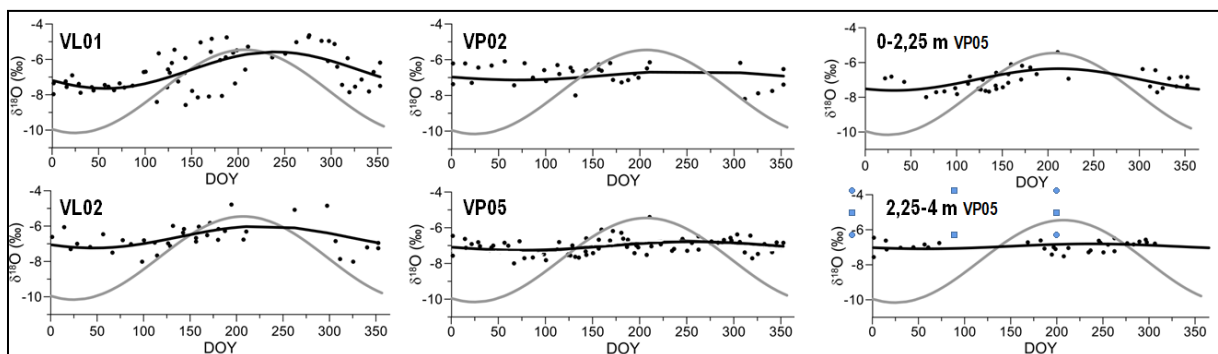
Lehenik eta behin, prezipitazio-uraren $\delta^{18}\text{O}$ datu isotopikoen multzoari egokitu zitzaion sinusoidea, eta parametroen kalkulua burutu zen. 3. irudian ikusten den moduan, Can Vila arroko euri-uraren konposizio isotopikoak urtaroko aldaketa bortitzak aurkezten ditu, $\delta^{18}\text{O}$ balio altuenak udako hilabeteetan eta balio minimoak neguan atzematen direlarik. Bariazio horiek, tenperaturak kontrolatzen ditu. Udan, tenperatura altuagoa izanik, prezipitazio-uraren lurrunketa handia da eta prezipitazioaren konposizio isotopikoa, isotopo astunetan aberasten da. Neguan berriz, tenperatura baxuagoak direnez, prezipitazio-ura ez da lurruntzen, $\delta^{18}\text{O}$ balio baxuagoak aurkeztuz.

3. irudia. Prezipitazio-uraren $\delta^{18}\text{O}$ urtaroko bariazioak eta egokitutako sinusoidea. Urtearen erdialdean (udako hilabetetan) $\delta^{18}\text{O}$ balio altuenak antzematen dira, eta neguko hilabetetan, balio minimoak.



Ondoren, lurzoruko, lurrazpiko eta Can Vila erreka uraren uhin sinusoidalaren egokitzea eta honen parametroen kalkulua burutu zen. Sinusoideak, prezipitazio-uraren datu isotopikoei egokitutako sinusoidearekin alderatuak izan ziren. Gero, irteerako eta sarrerako seinaleen anplitudeen arteko zatiketaz, ur gazte frakzioen balioak kalkulatu ziren. Ur gazte frakzioen balioak 1. taulan ageri dira.

4. irudia. $\delta^{18}\text{O}$ isotopoaren urtaroko zikloak eta sinusoidearen egokitzapena lurzoruko (VL01 eta VL02) eta lurrazpiko (VP02 eta VP05; VP05 puntuan 0-2,25 eta 2,25-4 m-ko sakonera tartek) uretan. Prezipitazioaren sinusoidea kolore grisez ageri da. Lurzoruko seinale isotopikoa leunduta dago sarrerako seinalearekin alderatuz. Seinale isotopikoaren leuntzea are eta nabarmenagoa da lurrazpiko uretan.



Lurzoruko uren (VL01 eta VL02) eta lurrazpiko uren (VP01 eta VP05) datu isotopikoen uhin sinusoidalak 4. irudian aurkezten dira. Sarrerako seinalearen (prezipitazioaren) uhin sinusoidalarekin alderatuz (gris koloreko uhina), irteerako seinaleak leunduta daude, hau da, anplitude txikiagoa daukate.

Lurzoruko uretan lortutako ur gazte frakzioak, % 43 (VL01 puntuan) eta % 26 (VL02 puntuan) izan ziren. Laurdena eta erdia bitarteko ur gazte frakzioa izanik, Can Vila arroko lurzoruko uren igarotze-denbora laburra dela adierazi daiteke.

1. taula. Prezipitazioaren, lurzoruko uren (VL01 eta VL02), lurrazpiko uren (VP02 eta VP05; VP05 puntuan 0-2,25 eta 2,25-4 m-ko sakonera tartek) eta ur-emari balioak erabiliz haztatutako eta haztatu gabeko erreka uraren konposizio isotopikoaren uhin sinusoidalaren anplitude-balioak eta ur gazte frakzioak. Ziurgabetasunak errore estandar moduan (SE) ageri dira.

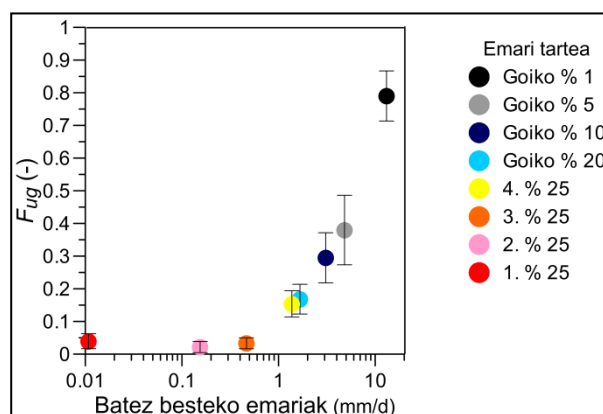
	Prezip.	VL01	VL02	VP01	VP05	0-2,25m VP05	2,25-4m VP05	Haztatu gabeko erreka ura	Emariaz haztatu. erreka ura
A (‰)	2,354	1,0354	0,619	0,174	0,235	0,626	0,053	0,187	0,697
SE: A	0,375	0,177	0,176	0,176	0,076	0,145	0,068	0,018	0,066
F_{ug} (-)		0,439	0,264	0,074	0,099	0,265	0,023	0,079	0,296
SE: F_{ug}		0,145	0,117	0,087	0,048	0,128	0,011	0,020	0,075

Lurrazpiko urei dagokionez, urtaroko ziklo isotopikoei egokitutako uhin sinusoidalak lerro horizontal bat irudikatzen dute VP02 eta VP05 puntuetan, F_{ug} balio txikiekin bat datorrena (% 7 eta 6, hurrenez hurren). Bestalde, VP05 puntuan, datu isotopikoen multzoa bi azpi-multzoetan banatu zen, -2,25 m-ko ur-mailatik gora eta behera hartutako laginen datu isotopikoak banatuz. Ur zutabearen azpi-multzo bakoitzean F_{ug} balioa kalkulatu zen. Horrela, ur gazte frakzioa ur-mailaren menpekota dela ikusi zen. Hau da, ur-maila altuetan (0 m-tik -2,25 m-ra), eta hortaz, garai hezeetan, F_{ug} -a % 26,5 izan da, lurzoruko uraren parekoa. Garai lehorretan ordea, ur-maila -2,25 m-tik behera dagoen garaietan, F_{ug} 10 aldiz txikiagoa izan da (% 2,3). Horrek, garai lehorretan lurpeko ura denbora asko gordeta dagoela adierazten du, garai hezeetan ordea, lurrazpiko urak berritu egiten dira eta igarotze-denborak txikiagoak dira.

Azkenik, Can Vila erreka emarien eta konposizio isotopikoaren datuak haztatu gabeko eta ur-emariak erabiliz haztatutako ur gazte frakzioak kalkulatzeko erabili ziren (F_{ug} eta F_{ug}^* , hurrenez hurren). Emariengatik haztatutako ur gazte frakzioa % 29,6 izan da, haztatu gabeko ur gazte frakzioa baino 4 aldiz handiagoa (F_{ug} : % 7,9). Izan ere, erreka emari handiek txikiak baino ur gazte frakzio gehiago dute, emari handiko garaiak berriki eroritako euri-jasa handien ondoren baitatoz. Hau dela eta, ganorazko laginketa estrategiak, emari handiko garaiak lagintzera bideratuak izan behar dira, Can Vilan egin den bezala.

Emariengatik haztatutako ur gazte frakzioa, haztatu gabekoa baino handiagoa izanik, F_{ug} eta erreka emarien arteko erlazio positiboa ezarri daiteke. Erlazio hori, erreka uraren datu isotopiko multzoa, emari tarte desberdinetan bereiziz, eta tarte bakoitzaren sinusoidaren anplitudea eta F_{ug} balioak kalkulatu irudikatu daiteke. Horrela, erreka uraren datu isotopiko seriea 1., 2., 3. eta 4. kuartiletan eta goi-emarien % 20, % 10, % 5 eta % 1 emari tarteetan bereizi zen. Tarte bakoitzean, uhin sinusoidala egokitu eta F_{ug} balioa kalkulatu zen. 5. irudian emari tarte desberdinetan kalkulatuak F_{ug} balioak irudikatzen dira.

5. irudia. Can Vila erreka ur-emari tarte bakoitzaren ur gazte frakzioa (eskala logaritmikoa). Ziurgabetasunak, errore estandar moduan (SE) adierazten dira. Ur gazte frakzioa ur-emariekin handitzen da.



5. irudian bistaratzen denez, ur gazte frakzioa nabarmenki aldatzen da emari handietatik txikietara. Ur-emari txikietako tarteetan (agorraldietan) ur gazte frakzioa baxua den bitartean ($F_{ug} > 0,05$), goreneko ur-emarietan ur gazte frakzioa % 80 izatera iritsi daiteke. Irudiak, erreka ur gazte frakzioak ur-emariaren menpekotasun nabarmena duela irudikatzen du. Halaber, erreka emaria, arroaren hezetetasunaren adierazgarritzat jo daiteke. Horrela, ur-emari handiko baldintzetan, prezipitazio edota hezetetasun handiko garaietan ematen direnak, errekatik igarotzen den ur-emariaren kopuru handi bat, gainazaleko isurketa prozesu azkarren bidez eratorria dela frogatzen da. Uraren ibilbide azkar horiek, ibaiaren ibilguan zuzenean isuritako euri-ura, lurrazaletik ibai-ibilguraino isuritako ura eta lurzoruko maila permeabletatik ibairaino iristen den ura dira. Ibilbide horiei esker, igarotze-denbora laburreko, eta beraz, F_{ug} handiko urak drainatzen dira. Horrek, Can Vila arroko akuiferoaren izaeraren berri ematen du ere. Izan ere, Can Vilako akuiferoa, konduktibitate hidrauliko txikia duten material buztintsuetan kokatzen da, non bolumen handiko euri-jasak ematean, euri-ura zailtasun handiz infiltratu eta

biltegitratzen den. Prezipitazio-ura akuiferoaren ur-maila sakonenetan pixkanaka infiltratzen denean ordea, denbora luzez mantentzen da bertan, ondorioz, agorraldietako (1., 2. eta 3. kuartilak) ur gazte frakzioak zero inguruko balioa izanik.

5. Ondorioak eta etorkizunerako planteatzen den norabidea

Ikerlanak, Can Vila arro mediterraneoan lortutako lehenengo ur gazte frakzio balioak aurkeztu ditu. Can Vila arroan, lurzoruko urek aurkeztu zituzten F_{ug} baliorik altuenak. Lurrazpiko eta erreka ur gazte frakzio balioak ur-mailarekin eta erreka ur-emariarekin zuzenean erlazionatuta zeudela frogatu zen ere. Lurrazpiko uretan, ur-maila altuko garaietan (hezetasun handikoak) F_{ug} -a 10 aldiz handiagoa izan zen ur-maila baxuko garaietan (garai lehorretan) baino. Era berean, erreka uretan emariagatik haztatutako F_{ug} balioak, balio haztatu gabeak baino 4 aldiz txikiagoak izan ziren. Hain zuzen ere, ur-emari handiak bolumen handiko euriteen ondorioz ematen dira, ur berri asko dutenak. Ur gazte frakzioa erreka ur-emari tarte desberdinetan kalkulatu, F_{ug} ur-emariarekin batera handitzen dela egiaztatu zen. Horrek, ur-emari handiko garaietan gainazaleko isurketa prozesu azkarrak nagusitzen direla adierazten du. Ordea, agorraldietan ur gazte frakzioa oso txikia izan zen. Hau dela eta, Can Vila akuiferoaren biltegitratze ahalmen txikia ondorioztatu zen ere.

Ikerlana, Vallcebre Ikerketa Arroetan ur gazte frakzioaren metodologiaren aplikazioaren lehenengo urratsa izan da. Ur gazte frakzioaren espazio-denbora aldaketak neurtzea da ikerketaren ondorengo helburua. Etorkizuneko ikerketek ez dituzte Vallcebre Ikerketa Arroetako ur gazte frakzioaren banaketari buruzko ezaguerak hobetuko bakarrik, baizik eta arro mediterraneoetakoak ere. Izan ere, eremu mediterraneoak Europako ingurune zaurgarrien artean kokatzen dira, gaur egun azkartzen ari den Aldaketa Globalaren eraginaren ondorioz.

6. Erreferentziak

- Craig, H. (1961): Isotopic variations in meteoric waters. *Science*, 133(3465): 1702-1703
- Jasechko, S., Kirchner, J. W., Welker, J. M., eta McDonnell, J. J. (2016): Substantial proportion of global streamflow less than three months old. *Nature Geoscience*, 9: 126-129.
- Kirchner, J. W. (2016): Aggregation in environmental systems-Part 1: Seasonal tracer cycles quantify young water fractions, but not mean transit times, in spatially heterogeneous catchments. *Hydrology and Earth System Sciences*, 20: 279- 297.
- Latron, J. eta Gallart, F. (2007): Seasonal dynamics of runoff-contributing areas in a small mediterranean research catchment (Vallcebre, Eastern Pyrenees). *Journal of Hydrology*, 335(2): 194-206.
- Llorens, P., Gallart, C., Cayuela, C., Roig-Planasdemunt, M., Casellas, E., Molina, A., Moreno de las Heras, M., Bertran, G., Sánchez-Costa, E. eta Latron, J. (2018): What have we learnt about Mediterranean catchment hydrology? 30 years observing hydrological processes in the Vallcebre research catchments. *Cuadernos de Investigación Geográfica*, 44(2): 475-501.
- McGuire, K.J. eta McDonnell, J.J. (2006): A review and evaluation of catchment transit time modeling. *Journal of Hydrology*, 330(3-4): 543-563.
- McGuire, K.J. eta McDonnell, J.J. (2008): Stable isotope tracers in watershed hydrology, non: Michener, R., Lajtha, K. (arg.). *Stable isotopes in Ecology and Environmental Science*. Blackwell Publishing, Oxford, 334-374 or.
- Roig-Planasdemunt, M., Llorens, P. eta Latron, J. (2016): Seasonal and strom dynamics of Dissolved Organic Carbon in a Mediterranean mountain catchment (Vallcebre, Eastern Pyrenees). *Hydrological Science Journal*, 62(1): 50-63.

7. Eskerrak eta oharrak

Eskerrak eman nahi dizkiet IDAEA-CSIC-eko Francesc Gallart, Pilar Llorens eta Jérôme Latron-i lan hau aurrera ateratzen lagundu izanagatik. Eskerrak eman nahi dizkiet ere, IDAEA-CSIC-eko Gainazaleko Hidrologia eta Higadura taldeko gainontzeko ikerlariei, ikasketa prozesua errazteagatik. Ikerketa hau, TransHyMed (CGL2016-75957-R AEI/FEDER, UE) eta MASCCDYNAMITE (PCIN-2017-061/AEI) proiektuak finantzatu izan da.

Euskal Herriko ferra-saguzarren dieten gainezarpena

Aldasoro, Miren; Aihartza, Joxerra; Arrizabalaga-Escudero, Aitor; Goiti, Urtzi; Baroja, Unai;
Vallejo, Nerea eta Garin, Inazio

*Jokamoldearen Ekologia eta Eboluzioa Ikertaldea, Zoologia eta
Animali Zelulen Biologia Saila, UPV/EHU*

maldasoro005@ikasle.ehu.eus

Laburpena

Euskal Herrian hiru ferra-saguzar ditugu: *Rhinolophus euryale*, *Rhinolophus hipposideros* eta *Rhinolophus ferrumequinum*. Animalien ekologia eta jokaera ulertu ahal izateko harrapari eta harrapakinen arteko elkarrekintza ezagutzea ezinbestekoa da. Izan ere, antzekoak diren espezieen koexistentzia ahalbidetzen duen faktoreetako bat nitxo trofikoaren partiketa da. Hori dela eta, ikerketa honen helburua espezie hauen dieta molekularki karakterizatzea eta beraien nitxoaren gainezarpena aztertzea izan da. *R. hipposideros*-en dietan agerpen gehienak dipteroei dagozkie, *R. euryale*-rean lepidopteroei eta *R. ferrumequinum*-enean diptero, koleoptero eta lepidopteroei. Harrapakinetak hamabi espezie soilik behatu dira hiru saguzarren dietan. Nitxo trofikoaren partiketa, beraz, nahiko handia da, espezieak binaka hartuta gainezartzerik handiena (%50) *R. hipposideros* eta *R. ferrumequinum* espezieen artekoa izanik.

HITZ-GAKOAK: Dieta, nitxo-partiketa, *Rhinolophus euryale*, *Rhinolophus hipposideros*, *Rhinolophus ferrumequinum* Joxerra Aihartza, Aitor Arrizabalaga Escudero, Urtzi Goiti, Unai Baroja, Nerea Vallejo and Inazio Garin

Abstract

There are three horseshoe bats in the Basque Country: *Rhinolophus euryale*, *Rhinolophus hipposideros* and *Rhinolophus ferrumequinum*. Knowledge on the trophic interactions between predators and its prey is important in order to understand ecology and behaviour of animals, since trophic niche partition is one of the factors allowing the coexistence of similar species. Therefore this study aims to characterize these three bats' diets and analyse their niches overlap. Most occurrences in *R. hipposideros* belong to Diptera and Lepidoptera, to Lepidoptera in *R. euryale* and Lepidoptera, Diptera and Coleoptera in *R. ferrumequinum*. Only twelve prey species have been found in the three bats. Niche partitioning is noticeable, since the highest overlap is the one shown by *R. hipposideros* and *R. ferrumequinum* (%50).

KEYWORDS: Diet, niche partitioning, *Rhinolophus euryale*, *Rhinolophus hipposideros*, *Rhinolophus ferrumequinum*.

1. Sarrera eta aurrekariak

Saguzarrak oso talde dibertsoa dira, bai jokamoldeari zein babesleku edota elikadura-ohiturei dagokienez. Duela gutxira arte, ugaztun hauen dietaren azterketa gorotzetan aurkitzen ziren harrapakinen zatien identifikazio morfologikoan oinarritzen zen, eta horri esker eduki dugu saguzarren oinarritzko bazka-ekologiaren ezagutza. Identifikazio morfologikoaren mugak direla eta, baina, oraintsu arte dietaren deskribapena harrapakinen orden- edota familia-mailara soilik iritsi izan da, eta hau ez da nahikoa harraparien bazka-nitxoak zehaztasunez ezaugarritzeko, edo saguzarren zerbitzu ekologikoak garbi zehazteko. *DNA metabarcoding* edo sekuentziazio masiborako teknika molekularrek, aldiz, kontsumitutako harrapakinak espezie-mailaraino identifikatzea ahalbidetzen dute (Zeale *et al.* 2011, Bohmann *et al.* 2011, Alberdi *et al.* 2012) eta saguzarren ekologian sakontzeko aukera berriak ireki dituzte. Hala ere, ikusi da primerrek alborapenak dituztela eta, beraz, primer sorta ezberdinak erabiltzea garrantzitsua izan daitekeela emaitza ahalik eta fidagarrienak lortu ahal izateko (Alberdi *et al.*, 2018, Piñol *et al.*, 2018).

Honela, harrapari-harrapakin erlazioak hobeki ulertzeko, saguzarrek eskuragarri dituzten harrapakin guztietatik beraien dieta osatzen duten espezieen aukeraketa zertan datzan ikus daiteke: saguzarren ehiza-

errentagarritasunaren ikuspuntutik, harrapakinak zein ezaugarri morfologiko edota ekologikoren arabera aukeratzeko dituzten aztertu daiteke (Arrizabalaga-Escudero *et al.* 2015).

Harrapakin-harrapari erlazioaz gain, bazka-ekologia faktore garrantzitsua da antzeko espezieen koexistentzia ahalbidetzeko. Izan ere, animalia hauen biziraupena bermatzeko mekanismoa bazka-baliagaien —nitxo trofikoaren— partiketa dela argudiatu da (Chesson, 2000). Berriki, bizilekua konpartitzen duten espezie “bikien” dietaren analisia eginez, sintopian bizirauteko harrapakinaren bereizketa zein neurritan ematen den ikusi da (Arrizabalaga-Escudero *et al.* 2018). Horrez gain, bizilekua konpartitzen duten (eta ez duten) espezie ezberdineko aleen arteko dieten konparaketak nitxo-partiketa hori berezkoa den edo ikasketa-prozesu baten ondorio den erakus dezake halaber (Arrizabalaga-Escudero *et al.* 2018).

Areago, dietaren ezaugarriak eragin zuzena dauka espezieen kontserbazioan. Izan ere, arriskupeko espezieen kontserbaziorako eta haien harrapakin-eskuragarritasuna bermatzeko aldera, ez da ehiza-habitataren galera kontutan hartu beharreko faktore bakarra. Aitzitik, harrapakinek bizi-fase ezberdinetan garatzeko behar dituzten habitaten zaintza ere garrantzitsua izan daiteke. Honela, basoan ehizatzen duten saguzarren bazka diren intsektu asko ehiza-eremu horietatik at sortuak direla frogatu ahal izan da (hala nola, larre eta belardietan; Arrizabalaga-Escudero *et al.* 2015). Hortaz, haien bazka-premiak asetu ahal izateko ehiza-habitat egokiak asetzeaz gain, harrapakinek bizi-zikloan zehar behar dituzten eremuak ere babestu behar dira.

Errinolofido edo ferra-saguzarrek sudurrean daukaten ferra-itxurako azalaren tolesturari zor diote izena, zeina uhin-luzera oso laburreko ultrasoinuak emititzeko erabiltzen duten (Csorba *et al.* 2003). Europan bost errinolofido espezie daude; horietatik lau bizi dira Iberiar Penintsulan eta hiru Euskal Herrian. Azken hiru hauen kontserbazioari dagokionez, *Rhinolophus euryale* "galzorian" (EN) gisa sailkatuta dago Euskal Herrian, eta *R. hipposideros* zein *R. ferrumequinum* espezieak “kaltebera” (VU) dira. Penintsula Iberiarrean bizi diren lau espezieetatik *R. euryale* eta *R. mehelyi*-ren dietak molekularki aztertu berri dira (Arrizabalaga *et al.* 2015, 2018), baita *R. hipposideros* eta *R. ferrumequinum* ere Frantzian (Galan *et al.*, 2018). Hala ere, guztiek *primer* sorta bakarra erabili izan dute.

2. Ikerketaren helburuak

Ikerketa honen helburu orokorra Euskal Herrian ditugun ferra-saguzarren ekologia trofikoan sakontzea da, bi helburu espezifikotan banatuta:

1. *R. euryale*, *R. hipposideros* eta *R. ferrumequinum* espezieen dietak karakterizatzekoa bi *primer* sorta ezberdinez baliatuz.
2. Hiru espezieen arteko dieten gainezarpina eta nitxo trofikoaren partiketa aztertzea.

3. Ikerketaren muina

3.1. Materialak eta metodoa

Ikerketa honen aztergai nagusia diren ferra-saguzarren gorotzak, Euskal Herriko Unibertsitateko Zoologia eta Animalia Zelulen Biologia saileko "Jokabidearen Ekologia eta Eboluzioa" ikertaldeak azken urteotan MINECOK finantzatutako ikerketa-proiektuetan bilduak izan ziren, 2012. urteko uztailen. Horretarako, espezie hauen kolonia ezagunetan lagindu da, Karrantza eta Lea-Artibai bailaretan. Saguzarrak gaueko ehiza-saioetatik babeslekura itzultzen ari zirela harrapatzen ziren, harpa-sarek edo lanbro-sarek; gehienez ordu erdiz zakutotan banaka bananduta mantentzen ziren, bertan gorotza egin zezaten. Ondoren, animaliak babeslekuan bertan askatzen ziren, inolako kalterik egin gabe. Guztira 24 *Rhinolophus ferrumequinum* aleren lagin aztertu dira, 31 *R. hipposideros* -enak eta 18 *R. euryale*-renak (1. irudia).

1. irudia. Espezie modeloak. Ezkerretik eskuinera *R. ferrumequinum*, *R. euryale* and *R. hipposideros*.



Gorotzetako DNAREN erauzketa DNeasy PowerSoil Kit (Qiagen Inc., Valencia, CA) erauzketa-kitaren bitartez egin da, fabrikatzailearen pausoak jarraituz. Ondoren, PCR prozesua egin da DNAREN amplifikazioa lortzeko, *primer* markatuak erabiliz. Lehenik Zeale-ren *primer* sorta (Zeale et al., 2011) erabili da, zeinak DNA mitokondrialaren zitokromo oxidasa c I (COI) barra-kode gunearen 157bp luzerako artropodoekiko espezifikoa den eskualde bat (mini-COI bat) amplifikatzen duen. Bigarrenik Gillet-en *primerrak* erabili dira (Gillet et al., 2015) COI-aren 133bp luzerako gunea bat amplifikatzen dutenak, eta generalistagoak dira identifika ditzaketen harrapakinen aldetik. Lortutako aplikazioen sekuentziak Ion Torrent plataforman egin da.

Sekuentziak masiboz lortutako sekuentzia gordinak bioinformatikoki landu dira lehenik, sekuentziak kalitatearen arabera sailkatu eta berdinak batzeko. Lortutako sekuentziekin OTUak (Operational Taxonomic Units) eraiki dira. Hauek algoritmo baten bidez antzekotasun-maila espezifiko baten arabera taldekatutako sekuentziak dira, zeinak unitate taxonomikoaren portaera hartzen duten (Blaxter et al., 2005). OTUak eraikitzerako orduan, %97-ko antzekotasun mailatik gorako sekuentziak erabiliz. %1eko maiztasunetik beherako OTUak ezabatu egin dira.

OTUen esleipen taxonomikoa egiteko BOLD (Barcode Of Life Database) datu-baseko COI genearen sekuentzia publikoekin alderatu dira (<http://boldsystems.org/>), BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) eta GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) programen bitartez. Horretarako sekuentzien arteko parekako doitasunak ("pairwise identity") gutxienez %98koa izan behar du (Clare et al., 2014), beti ere identifikatutako espeziearen banaketa-eremuak ikerketa-eremuarekin bat egiten badu.

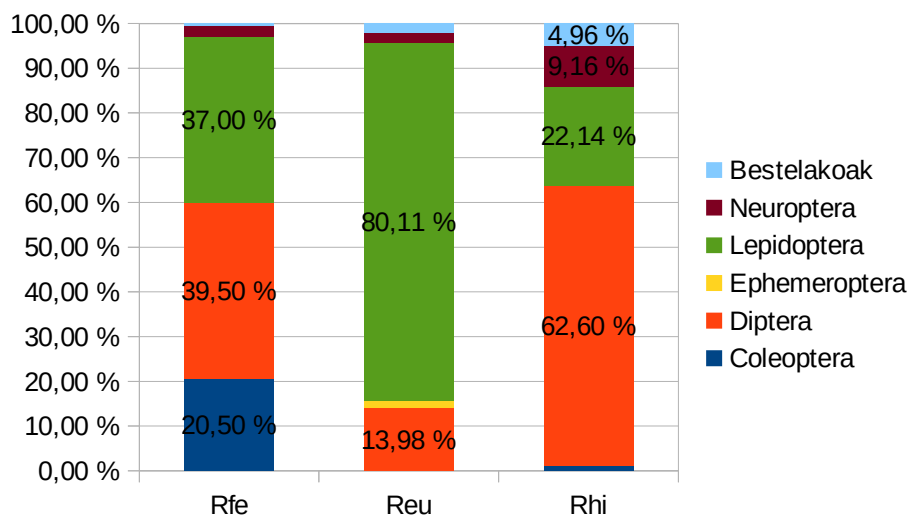
Behin oinarritzko informazio hau eskuratuta, *R. hipposideros*, *R. euryale* eta *R. ferrumequinum*-en dieten deskribapenak eta karakterizazioak egin dira lehenik. Emaitzak agerpen-portzentajea (Percentage of occurrence = POO) adierazi dira, hau da, harrapakin-taxoi bakoitzaren agerpenak taxoi guztien agerpen-kopuru totalaz zatituz lortutako ehunekoa (Deagle et al. 2018). Gainera, taxoi bakoitzaren agerpen maiztasuna (Frequency of occurrence = FOO) kalkulatu da, hau da, taxoi bakoitza zenbat laginetan agertzen den kalkulatu eta horren ehunekoa adierazi (Deagle et al. 2018).

Harrapari-harrapakinen erlazioaren azterketa estatistikorako R 3.3.2 (2016) programa erabili da: Behin harrapakinen ezaugarrien oinarritzko informazioa eskuratuta, ferra-saguzar espezieen arteko nitxo trofikoaren partiketa edo gainezarpenak zenbaterainokoak diren kalkulatu da Pianka-ren (1974) nitxoaren gainezarpen-indizearen bitartez "EcoSimR v0.1.0" paketea erabiliz. Ondoren, indibiduen dieten distantzietan oinarrituz NMDS (non-metric multidimensional scaling) bat eraiki da, "vegan v2.4-2" pakete (Oksanen et. al., 2018) metaMDS funtzioaren bitartez, multzokaketa eta erlazioak ikusteko. Azkenik, pakete bereko ADONIS analisia egin da dieten ezberdintasuna estatistikoki esanguratsua den ikusteko, hiru espezieen artean lehenengo eta binaka bigarrenik. Binakako espezieen dieten arteko ezberdintasuna aztertzeko RVAideMemoire 0.9-72 pakete (Hervé, 2014) *pairwise.perm.manova* funtzioa erabili da.

3.2. Emaitzak eta eztabaida

Saguzar bakoitzaren dietari dagokionez, *R. ferrumequinum*-entzat 62 harrapakin identifikatu dira: 34 lepidoptero, 17 diptero, 7 koleoptero, 2 neuroptero eta trikoptero bat. Lepidoptero eta dipteroak izan dira maiztasun handienaz kontsumitutako ordenak, koleopteroez jarraituta. *R. euryale*-rentzat 81 harrapakin-espezie identifikatu dira: 61 lepidoptero, 10 diptero, 5 neuroptero, 2 efemeroptero, trikoptero bat, hemiptero bat eta himenoptero bat. Sits-espezialista garbitzat har dezakegu, bere dietaren %80a lepidopteroetan oinarritzen baita, nahiz eta sits-espezie bakoitza banaka hartuta oso gutxitan kontsumitu den, espezie gutxi batzuk salbuetsita. Azkenik, *R. hipposideros*-entzat 73 harrapakin identifikatu dira: 33 lepidoptero, 28 diptero, 3 hemiptero, 3 neuroptero, 2 koleoptero, himenoptero bat, trikoptero bat, armiarma bat eta psokoptero bat. Dietan garrantzi handiena duen ordena dipteroena da, dietaren bi heren suposatzen duelarik (1. Irudia). Bestetik, nahiz eta maiztasun-ehunekoan duten ekarpena txikiagoa izan, aipatzekoa da lepidopteroak eta neuropteroak lagin erdietan baino gehiago agertu direla (2. Irudia).

2. irudia. Hiru espezieen emaitzak POO moduan adierazita. Rfe: *R. ferrumequinum*, Reu: *R. euryale*, Rhi: *R. hipposideros*. “Bestelakoak” maiztasun gutxieneko ordenak barne hartzen ditu: Araneae, hemiptera, hymenoptera, psocoptera eta trichoptera.



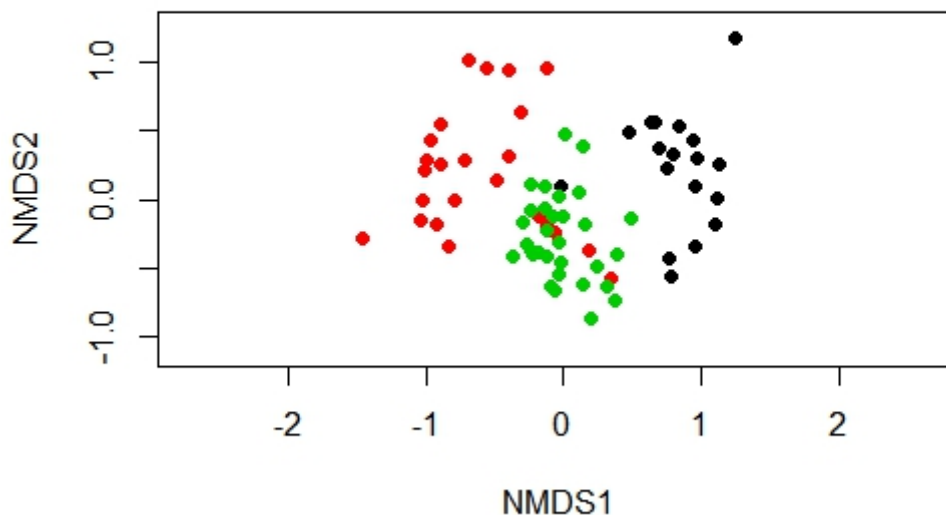
Hiru espezieetan agertu diren harrapakinak 12 izan dira: 6 lepidoptero (*Acronicta rumicis*, *Cyclophora punctaria*, *Idaea degeneraria*, *Anaplectoides prasina*, *Noctua sp.* eta *Udea ferrugalis*), 5 diptero (*Rhipidia maculata*, *Austrolimnophila ochracea*, *Limonia nubeculosa*, *Neolimonia dumetorum* eta *Tipula helvola*) eta neuroptero bat (*Hemerobius humulinus*).

Gure emaitzek aurretik identifikazio morfologikoan oinarrituz egindako ikerketen (Schober and Grimmberger, 1987; Vaughan 1997; Dietz, 2009; Ahmim and Moali, 2013) emaitzekin bat egiten dute, harrapakinen orden mailan. Azkeneko ikerketa molekularrek ere antzeko emaitzak lortu zituzten (Galan et al., 2018; Arrizabala-Escudero et al., 2015). Hala ere, arestian esan bezala, ikerketa horiek *primer* sorta bakarra erabili zuten, horrek dakartzan alborapenekin, eta gure ikerketan bi *primer* sorta erabili izanak espezie hauen dietaren irudi osatuagoa eta fidagarriagoa lortzea dakar. Hala, ikerketa morfologikoetan identifikatutako harrapakin-familietakoz batzuk, aurreko ikerketa morfologikoetan identifikatu ez zirenak, lan honetan identifikatzeko gai izan gara. Espezie-mailan ere aurretik identifikatu gabeko espezieak agertu zaizkigu gurean. Gainera, ikerketa morfologikoetan (Goiti et al., 2004) identifikatutako harrapakin genero batzuen antzekoak (*Rhizotrogus sp.* vs. *Serica brunnea*) identifikatu dira lan honetan, eta horrek begi bistako identifikazioa okerra izan zitekeela iradokitzen du.

Halaber, lagin gehienetan harrapakaria identifikatzeko gai izan gara (22 *R. ferrumequinum* lagin (%92), 18 *R. euryale* lagin (%100), 31 *R. hipposideros* lagin (%100)). Hau abantailatsua izan daiteke saguzarren identifikazio morfologikoa nahasgarria den kasuetan, edota laginketa ez denean indibiduoka egiten, baizik eta gorotzak kolonietatik hartzen direnean.

Bestalde, Piankaren nitxo trofikoaren partiketa balioak erakusten digu Euskal Herrian ditugun hiru ferra-saguzarren dietak %34-eko gainezarpina dutela ($O_{jk} = 0,34$, $P = 0,002$). Aldiz, espezieak bikoteka hartzen baditugu, *R. hipposideros* eta *R. ferrumequinum*-ek dieta osaeraren %50a elkarbanatzen dute, *R. hipposideros* eta *R. euryale*-k %38a eta *R. ferrumequinum* eta *R. euryale*-k, azkenik, %15a. Hala ere, espezie bakoitzeko aleek taldekapen argiak erakusten dituzte, eta elkarrengandik modu garbian ezberdindu daitezke (3. Irudia). Hiru espezieen artean egindako ADONIS analisiak ideia hau indartzen du, saguzar-espezieak dietaren osaeran ezberdintasun esangarriak ezartzen dituela babestuz, $P < 0,001$ izanik. Gainera, binakako analisia egitean ikus daiteke bai *R. hipposideros* - *R. ferrumequinum*, *R. hipposideros* - *R. euryale*, zein *R. ferrumequinum* - *R. euryale*-n bikoteetan ezberdintasuna estatistikoki esanguratsua dela ($P < 0,001$).

3. irudia. NMDS bidezko laginen ordenazioa. Stress = 0.1748; k = 2. Hiru espezieen emaitzak POO moduan adierazita. Gorritz: *R. ferrumequinum*, berdez *R. euryale* eta beltzez *R. hipposideros*.



Arestian ikusi bezala, hiru ferra-saguzarrek haien dietaren osagai nagusi diren harrapakin ordenak konpartitzen dituzte (diptero eta lepidopteroak, bereziki). Horrek nitxo trofikoaren nolabaiteko gainezarpina iradokitzen du. Espezie mailara jeistean, aldiz, partekatzen dituzten harrapakinen kopurua asko jeisten da. Horrela, nahiz eta antzeko ingurunetan bizi diren eta maila taxonomikoan antzekoak diren harrapakinak ehizatzen dituzten, euren artean espezializazio-maila nahiko handia dutela ikus dezakegu. Emaitzen arabera, *R. euryale*, bereziki sits-espezialista izanik, beste bi saguzarrekiko gainezarpin txikiena duena da. *R. ferrumequinum* eta *R. hipposideros*-en dietetan, aldiz, dipteroek garrantzi handia dute, haien nitxo trofikoaren arteko gainezarpina handituz. Hala ere, *R. hipposideros*-ek limonido txikiak jaten dituzte bereziki, eta *R. ferrumequinum*-ek, oster, tipulido handiagoak, lepidoptero noktuido eta geometrido handiekin batera. Beraz, argi dago dieten osaeraren arteko ezberdintasunaren atzean saguzar-espeziea gakoa dela. Gainera, *R. ferrumequinum* koleopteroak bezalako harrapakin handi eta gogorrak jateko gai da, horrek nitxoa zabaltzea eta gainontzekoen konpetentziaz alde egiteko aukera ematen diolarik.

Euskal Herriko ferra-saguzarren kontserbazio-egoerari erreparatuz, espezie bakoitzaren dieta zertan oinarritzen den ezagutuz harrapakinen inguruneak babestu daitezke, eta honek saguzarren nitxo ekologikoa babesteko aukera ematen du. Espezieen kontserbazioan zutabe garrantzitsuetako bat dira beharkizun dietetikoak, baina honen atzean dagoen arazoa da dietaren ezagutza oso mugatuta izaten dela (Kunz & Fenton, 2005). Harrapakinen ekologia ezagutuz gero, bizi-fase ezberdinetan zehar erabiltzen dituzten habitatak ezagutu daitezke, eta horrela kiropteroek behar dituzten harrapakinen biziraupena ahalbidetu

daiteke (Arrizabalaga-Escudero *et al.*, 2015). Harrapakinen habitatak babesteak, beraz, saguzarrei onurak ekar diezake. Esaterako, Erresuma Batuan *R. ferrumequinum*-ek bereziki *Aphodius* generoko gorotzetako koleopteroak jaten ditu. Uda-amaieran larreetan nagusi dena, saguzarren kontserbazio-planean, nekazari eta abeltzainei sustapen ekonomiko bat ematea jasotzen da larreak mantendu eta kakalardoek gainbehera eragin dezaketen ekintzak ekiditzearren (Entwistle *et al.*, 2001). Ikerketa honetan ere *Aphodius* generoko kakalardoak agertu dira ferra-saguzar handiaren dietan, eta beraz, antzeko neurriak hartzea komenigarria litzateke gurean ere. Orokorrean, espezie bakoitzaren harrapakin nagusien beharrianak kontserbazio planen babes-neurrietan kontutan hartzea, hortaz, onuragarria izan daiteke saguzarren beraien kontserbaziorako, bereziki espezializazio maila handiena erakusten duten espezieei dagokienez (Kunz & Fenton, 2005).

Azkenik, aipagarria da ferra-saguzarren dietetan nekazal izurrite izan daitezkeen hainbat sits agertu direla: *Agrotis exclamationis* (*R. euryale* eta *R. ferrumequinum*), *Agrotis ipsilon* (*R. ferrumequinum*), *Agrotis segetum* (*R. euryale*), *Apamea monoglypha* (*R. euryale*), *Hoplodrina sp.* (*R. euryale*), *Mythimna albipuncta* (*R. ferrumequinum*), *Mythimna vitellina* (*R. ferrumequinum* eta *R. hipposideros*) eta *Noctua sp.* (*R. ferrumequinum*, *R. euryale* eta *R. hipposideros*). Izaera intsektujaleari lotuta saguzarrek eragindako ekosistema-zerbitzuen artean, basogintzako eta nekazal izurriteen kontrolean saguzarrek izan dezaketen papera azaleratzen hasi da azken urteotan (Maine *et al.*, 2015; Krauel *et al.*, 2018), ur-jauzi efektua izan baitezakete nekazal izurriteen gain (Cleveland *et al.*, 2006). Horrela, nekazaritzan pestizida kimikoak ekiditzera bidean, kontrol biologikoa ordezko aukera garrantzitsu bat da. Hurrengo ikerketetan lan honen jomuga diren saguzar-espezieak zein nekazal arloetan izan daitezkeen erabilgarri aztertzea interesgarria izango litzateke.

4. Etorkizunerako norabidea

Etorkizunerako hainbat helburu planteatzen dira:

- *Rhinolophus hipposideros* ferra-saguzar txikiaren dietaren deskribapena egitea, urte-sasoien arabera (kumatze aurretik, kumatze bitartean eta edoski-garaiaren amaieran) eta geografikoki (eskualde eurosiberiarrean eta mediterranearrean) izan dezakeen aldakortasuna kontutan izanik.
- *Rhinolophus ferrumequinum* ferra-saguzar handiaren dietaren deskribapena egitea, kontsumitutako harrapakin-espezieen aldakortasuna aztertuz, urte-sasoien arabera (kumatze aurretik, kumatze bitartean eta edoski-garaiaren amaieran) eta geografikoki (eskualde eurosiberiarrean eta mediterranearrean) izan dezakeen aldakortasuna kontutan izanik..
- Iberiar Penintsulako ferra-saguzarren nitxo trofikoak bereiztea, harraparien ezaugarri morfofuntzionaletan eta ekologikoetan oinarrituta.
- Ferra-saguzarretan ikasketa-prozesuak eta garapenak ekologia trofikoan izan dezakeen eragina aztertzea, helduen eta urteko gazte hegalarien harrapakinen arteko ezberdintasunak ikertuz.

5. Bibliografia

- Ahmim, M., & Moali, A. (2013). The diet of four species of horseshoe bat (Chiroptera: Rhinolophidae) in a mountainous region of Algeria: evidence for gleaning. *Hystrix, the Italian Journal of Mammalogy*, 24(2), 174-176.
- Alberdi, A., Garin, I., Aizpurua, O., & Aihartza, J. (2012). The foraging ecology of the mountain long-eared bat *Plecotus macrobullaris* revealed with DNA mini-barcodes. *PLoS One*, 7(4), e35692.
- Alberdi, A., Aizpurua, O., Gilbert, M. T. P., & Bohmann, K. (2018). Scrutinizing key steps for reliable metabarcoding of environmental samples. *Methods in Ecology and Evolution*, 9(1) 134-147.
- Arrizabalaga-Escudero, A., Clare, E. L., Salsamendi, E., Alberdi, A., Garin, I., Aihartza, J., & Goiti, U. (2018). Assessing niche partitioning of co-occurring sibling bat species by DNA metabarcoding. *Molecular ecology*, 27 (5), 1273-1283.

- Arrizabalaga-Escudero, A., Garin, I., García-Mudarra, J. L., Alberdi, A., Aihartza, J., & Goiti, U. (2015). Trophic requirements beyond foraging habitats: The importance of prey source habitats in bat conservation. *Biological Conservation*, 191, 512-519.
- Blaxter, M., Mann, J., Chapman, T., Thomas, F., Whitton, C., Floyd, R., & Abebe, E. (2005). Defining operational taxonomic units using DNA barcode data. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 360(1462), 1935-1943.
- Bohmann, K., Monadjem, A., Noer, C. L., Rasmussen, M., Zeale, M. R., Clare, E., ... & Gilbert, M. T. P. (2011). Molecular diet analysis of two African free-tailed bats (Molossidae) using high throughput sequencing. *PloS one*, 6(6), e21441.
- Clare, E. L., Symondson, W. O., Broders, H., Fabianek, F., Fraser, E. E., MacKenzie, A., ... & Menzies, A. K. (2014). The diet of *Myotis lucifugus* across Canada: assessing foraging quality and diet variability. *Molecular Ecology*, 23(15), 3618-3632.
- Chesson, P. (2000). General theory of competitive coexistence in spatially-varying environments. *Theoretical population biology*, 58(3), 211-237.
- Cleveland, C. J., Betke, M., Federico, P., Frank, J. D., Hallam, T. G., Horn, J., ... & Sansone, C. G. (2006). Economic value of the pest control service provided by Brazilian free-tailed bats in south-central Texas. *Frontiers in Ecology and the Environment*, 4(5), 238-243.
- Csorba, G., Ujhelyi, P., & Thomas, N. (2003). *Horsheshoe bats of the World:(Chiroptera: Rhinolophidae)*. Alana books.
- Chesson, P. (2000). Mechanisms of maintenance of species diversity. *Annual review of Ecology and Systematics*, 31(1), 343-366.
- Deagle, B. E., Thomas, A. C., McInnes, J. C., Clarke, L. J., Vesterinen, E. J., Clare, E. L., ... & Eveson, J. P. (2018). Counting with DNA in metabarcoding studies: how should we convert sequence reads to dietary data?. *Molecular ecology*.
- Dietz C, Nill D, von Helversen O (2009) *Bats of Britain, Europe and Northwest Africa*. A & C Black, London.
- Entwistle, A. C., Harris, S., Hutson, A. M., Racey, P. A., Walsh, A., Gibson, S. D., ... & Johnston, J. (2001). Habitat management for bats.
- Galan, M., Pons, J. B., Tournayre, O., Pierre, E., Leuchtmann, M., Pontier, D., & Charbonnel, N. (2018). Metabarcoding for the parallel identification of several hundred predators and their prey: Application to bat species diet analysis. *Molecular ecology resources*, 18(3), 474-489.
- Gillet, F., Tiouchichine, M. L., Galan, M., Blanc, F., Némot, M., Aulagnier, S., & Michaux, J. R. (2015). A new method to identify the endangered Pyrenean desman (*Galemys pyrenaicus*) and to study its diet, using next generation sequencing from faeces. *Mammalian Biology-Zeitschrift für Säugetierkunde*, 80(6), 505-509.
- Goiti, U., Aihartza, J. R., & Garin, I. (2004). Diet and prey selection in the Mediterranean horseshoe bat *Rhinolophus euryale* (Chiroptera, Rhinolophidae) during the pre-breeding season. *Mammalia mamm*, 68(4), 397- 402.
- Hervé, M. (2014). RVAideMemoire: Diverse basic statistical and graphical functions. *R package version 0.9-* 50.
- Krauel, J. J., Brown, V. A., Westbrook, J. K., & McCracken, G. F. (2018). Predator-prey interaction reveals local effects of high-altitude insect migration. *Oecologia*, 186(1), 49-58.
- Kunz, T. H., & Fenton, M. B. (Eds.). (2005). *Bat ecology*. University of Chicago Press.
- Maine, J. J., & Boyles, J. G. (2015). Bats initiate vital agroecological interactions in corn. *Proceedings of the National Academy of sciences*, 112(40), 12438-12443.
- Oksanen J., Blanchet F. G., Friendly M., Kindt R., Legendre P., McGlinn D., Minchin P. R., O'Hara R. B., Simpson G. L., Solymos P., Stevens M. H. H., Szoecs E. and Wagner H. (2018). *Vegan: Community Ecology Package*. *R package version 2.5-1*.
- Piñol, J., Senar, M. A., & Symondson, W. O. (2018). The choice of universal *primers* and the characteristics of the species mixture determine when DNA metabarcoding can be quantitative. *Molecular ecology*.
- Schober, W., & Grimmberger, E. (1987). *Die Fledermäuse Europas: kennen-bestimmen-schützen*. Franckh.
- Vaughan N. (1997). The diet of British Bats (Chiroptera). *Mammal Review* 27(2): 77-94.
- Zeale, M. R., Butlin, R. K., Barker, G. L., Lees, D. C., & Jones, G. (2011). Taxon-specific PCR for DNA barcoding arthropod prey in bat faeces. *Molecular ecology resources*, 11(2), 236-244.

6. Eskerronak

Ikerketa hau Eusko Jaurlaritzak (IT754-13 proiektua) eta Espainiako Gobernuak (CGL2012-38610; CGL2015-69069-P) diruz lagundu dute. Eskerrak eman nahi dizkiet Euskal Herriko Unibertsitateari eta Zientzia eta Teknologia Fakultateari. Eskerrik handien eta zintzoenak Joxerra Aihartza eta Inazio Garin zuzendariei ikerlan honen bidean itsasargi eta berme izanagatik. Laborategi-lanetako hastapenetan bidea argitu didaten Unai Baroja, Aitor Arrizabalaga eta Inaziori. Aitorri berriz ere bere pazientzia agorgabearengatik, bioinformatika eta estatistikako zalantza guztiak - gutxi izan ez direnak - edozein momentutan argitzeko prest egoteagatik. Azkenik, Nerea ikaskide eta lagunari bide hontan elkarren sostengu izanagatik eta “Jokamoldearen ekologia eta eboluzioa” ikerketa-taldeko kide guztiei kurtso hontan zehar kide eta lagun izanagatik.

Harrapakinen partiketa ehizamolde ezberdineko saguzarretan: *Plecotus austriacus* (Fisher, 1829) eta *Hypsugo savii* (Bonaparte, 1837) espezieen kasua

Vallejo, Nerea¹; Ibañez, Carlos²; Nogueras, Jesus²; Arrizabalaga-Escudero, Aitor¹ eta Garin, Inazio¹

¹Zoologia eta Animalia Zelulen Biologia Departamentua, UPV/EHU

²Estación Biológica de Doñana, CSIC, Sevilla
nerea.vallejo@ehu.eus

Laburpena

Baliabideak mugatzaile direnean, haien partiketa ezinbestekoa da espezie sinpatrikoen koexistentzia bermatzeko. Ehizamolde ezberdineko bi saguzar-espezieen dieta aztertu dut, teknika molekularrak erabiliz: *Plecotus austriacus*, eremu itxietan ehizatza moldatua dagoena; eta *Hypsugo savii*, eremu irekiak nahiago dituen. *P. austriacus*-en dietan 33 taxon identifikatu nituen eta *H. savii*-ren kasuan 46, gehienak lepidopteroak zirelarik. Lau harrapakin taxon baino ez ziren detektatu bi espezieen dietan, nitxoan gainezarpeneren balio txikia iradokitzen duena. Harrapakinen ezaugarriek oro har, bi saguzar hauen kasuan ezaugarri ekomorfologiko eta jokabidezkoek harrapakinen partiketa errazten dutela iradokitzen dute, haien koexistentzia erraztuz.

Hitz gakoak: dieta, ezaugarri ekomorfologiko, saguzar, teknika molekularrak

Abstract

When resources are limiting, their partitioning is vital for the coexistence of sympatric species. I analysed the diet of two bat species of different hunting strategies, using molecular techniques: Plecotus austriacus, which is adapted to forage in cluttered spaces, and Hypsugo savii, which prefers open spaces. 33 taxa were identified in the diet of P. austriacus, and 46 in the diet of H. savii, the majority being Lepidoptera. Only four prey items were identified in both species, resulting in low niche overlap between both species. Prey traits, overall, show that morphological and behavioural differences facilitate prey partitioning between these two bat species, allowing their coexistence in sympatry.

Keywords: Bats, diet, ecomorphological characteristics, molecular techniques

1. Sarrera

Saguzar intsektiboroen artean ekomorfologia eredu ezberdinak aurkitzen dira. Eredu ekomorfologikoa hego-forma (Norberg eta Rayner, 1987) eta ekokokapenaren ezaugarriekin (Bogdanowicz et al., 1999) lotua dago, hegakera gaitasuna eta harrapakinak detektatzeko ahalmena baldintzatzen duena. Honi esker, saguzarrek habitat eta nitxo trofiko espezifiko eta dibertsioak ustiatzen dituzte (Emrich et al., 2014), eta baliabide gutxiko edo lehia handiko sasoietan, hauek erabiltzeko modua aldatzeko gaitasuna dute (Razgour et al., 2012).

Bi saguzar-espeziek eredu ekomorfologiko ezberdinak badituzte habitat ezberdinak, edo habitat berdin baten eremu ezberdinak ustiatzera moldatuta egongo dira eta ondorioz kontsumituko dituzten harrapakinak desberdinak izatea espero da (Emrich et al., 2014). Hau bereziki garrantzitsua bihurtzen da bi saguzar-espezie edo gehiago sinpatrian bizi direnean, eredu ekologiko orokorraren arabera egoera honetan baliabideen gaineko lehia aurreikusten baita. Bi espezie hauen arteko koexistentzia gerta dadin, baliagaien partiketa gauzatu behar litzateke (Stephen eta Krebs, 1986).

Plecotus austriacus saguzar belarrihandien taldeko saguzar bat da. Hego zabal, labur eta borobilduak ditu, beraz hegakera motela izango du eta landaredi artean edo eremu itxietan mugitzen trebea izango da (Norberg eta Rayner, 1987). Genero honetako beste espezie batzuk bezalaxe, *Plecotus austriacus*-ek ekokokapen-seinale multi-armoniko bat erabiltzen du, banda zabalekoa (60-20 kHz) laburra eta intentsitate baxukoa (Dietrich et al., 2006). Saguzar

belarrihandi askok gainazalen gainean geldirik dauden harrapakinak ehizatzen dituzte (Norberg eta Rayner, 1987). *P. austriacus* hegaldian ehizatzen ikusia izan da nahiz eta morfologikoki generoko beste saguzar batzuen antzekoa izan (Razgour et al., 2012).

Hypsugo savii, ordea, eremu zabaletan ehizatzen duen saguzar bat da (Dorado-Correa et al., 2013). Hego luzeagoak eta zorrotzagoak ditu *Plecotus austriacus*-ek baino; ondorioz hegalaria azkarragoa da, baina maniobragarritasun txikiagoa du (Norberg eta Rayner, 1987). Bere ekokopakapen-pultsuak luzeak (12 ms) eta banda estukoak (34-32 kHz) dira (Zingg, 1988).

2. Aurrekariak eta ikerketaren helburuak

Dieta aztertzeko metodologia klasikoa harrapakinaren arrastoen azterketa morfologikoetan oinarritzen da erresoluzio txikiko informazio taxonomikoa ematen duena, kasu gehienetan harrapakinak familia- edo ordena-mailan baino ezin direlako identifikatu. Teknika molekularretan eman diren aurrerapenak dieta modu zehatzago batean aztertzea ahalbidetu dute, eta ondorioz hainbat saguzar-espezieren nitxo trofikoa ikertzeko erabili dira. Teknika honek informazio espezifiko ematen du harrapakinei buruz, saguzarraren ehiza-ohiturei buruz eta baita haien dietan ematen diren aldaketei buruz (Clare, 2014).

Hala ere, gure kontinenteko hainbat saguzar-espezieren kasuan ezagutza eskasa da oraindik ere, batez ere Europa Hegoaldean ohikoagoak diren espezieei buruzkoa: *P. austriacus* eta *H. savii* adibidez. Razgour et al.-ek (2012) teknika molekularrak erabiliz *P. austriacus*-en dieta aztertu zuen Hego Erresuma Batuan, eta batez ere sitsez osatutako dieta deskribatu zuen. *H. savii*-ren kasuan, dieta metodologia molekularrak erabiliz aztertu duen lanik ez da argitaratu iturri bibliografikoen arabera, beraz lan honek saguzar-espezie honen ekologia trofikoari buruzko informazio xehea eskainiko luke lehen aldiz. Eremu zabaletan intsektu hegalaria txikiak harrapatzen behatu da (Dorado-Correa et al., 2013), baina orokorrean ehiztari generalista gisa deskribatu daiteke, bere dieta ingurune baldintzen arabera aldatzeko ahalmena erakusten duelako (Whitaker eta Karatas, 2009).

Lan honen helburua azterketa molekularren bidez bi saguzar-espezie hauen artean harrapakinaren partiketa ematen den aztertzea da, eta banaketa hori baldintzatzen duten faktoreak azaltzea, ezaugarri ekomorfologikoek, alegia hegoen morfologiak eta ekokopakapenak, duten papera bereziki kontutan hartuz. Haien eredu ekomorfologikoan aurkeztzen dituzten ezberdintasunen ondorioz, eremu ezberdinetan behatu dira ehizatzen (Dorado-Correa et al., 2013; Razgour et al., 2012). Sinpatrian bizi diren heinean, haien koexistentzia bermatzeko baliabide trofikoaren banaketa egon beharko litzateke; beraz, bi espezieetan harrapakin espezie ezberdinak identifikatzea espero dugu.

3. Ikerketaren muina

Saguzarrak Andaluziako bost lekutan harrapatu genituen, haien gorotzak lortzeko asmoz. Laginketa eremuak Sierra Nevadako Parke Nazionalan (Granada); Sierra de Bazako Parke Naturalean (Granada); Cazorla, Segura eta Las Villas-eko Parke Naturalean (Jaén, 2 estazio); eta Sierra de las Nieves-eko Parke Naturalean (Málaga) kokatuak zeuden. Horietan denetan klima mediterranea da nagusi, eta landare formazio nagusiak konifero basoak, sastrakadi esklerofiloak eta trantsizio sastrakadiak dira.

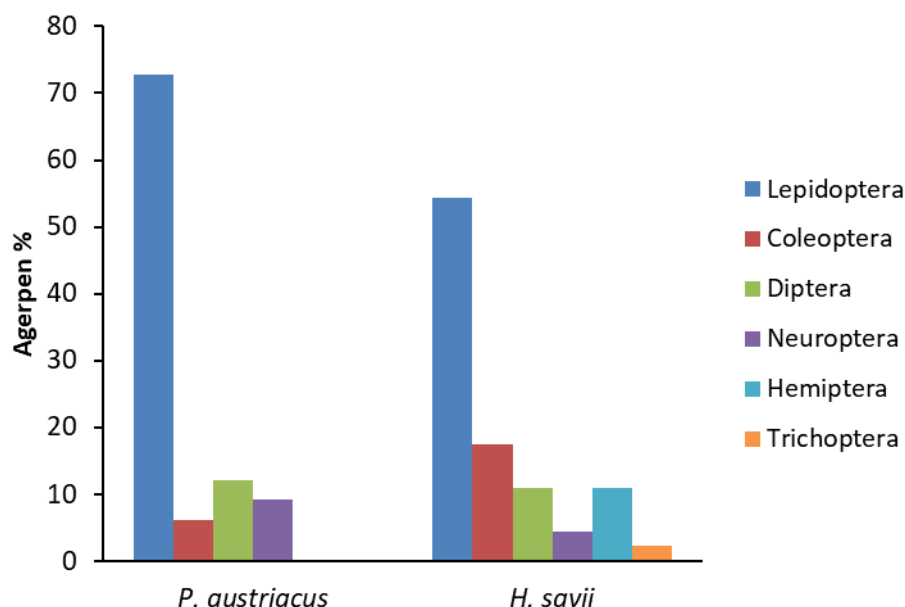
Guztira, 42 *P. austriacus* eta 28 *H. savii* harrapatu genituen, 2014ko uztailaren bigarren hamabostaldian, edalekuean, eta gau bakar batean estazio bakoitzeko. Harrapatu ondoren, saguzarrak oihalezko zaku batean mantendu genituen gorotza egin arte, 30-40 minutuz gehienez. Indibiduo bakoitzaren sexua eta adina determinatu genituen eta azkenik, saguzarrak askatu genituen.

Saguzar bakoitza lagin unitate gisa kontsideratu genuen, eta bakoitzaren 10-30 mg gorotz erabili genituen DNA erauzketa burutzeko. Erauzketaren ondoren, genoma mitokondrialean kokatzen den COI genearen sekuentzia bat hautatu genuen, eta PCR bidez amplifikatu genuen, sekuentzia honen

hainbat kopia lortzeko. Ondoren, errendimendu handiko sekuentziazioa erabiliz, lagin bakoitzeko milaka DNA sekuentzia irakurri genituen, saguzar-indibiduo bakoitzaren dieta karakterizatzea ahalbidetzen duena. Azkenik, irakurritako sekuentziak erabiliz MOTUak (*Molecular Operational Taxonomic Unit*) eraiki genituen. Hauek sekuentzien taldekapenak dira, sekuentzien arteko antzekotasunaren arabera sortzen direnak, eta harrapakin espezieen identifikaziorako erabilgarriak direnak. MOTU bakoitza BOLD¹ erreferentzia datu-basearekin erkatu genuen identifikazio taxonomikoa egiteko.

P. austriacus-en laginetan 33 taxon ezberdin identifikatu genituen espezie-mailan. Hauetatik 24 lepidopteroak ziren, 4 dipteroak, 3 neuropteroak eta 2 koleopteroak. Saguzar gehienek lepidopteroak kontsumitu zituzten (1. irudia). Espezie ohikoena pinu-beldarra (*Thaumetopoea pityocampa*) izan zen, aztertutako gorotzen %74an agertu zena; gainerako harrapakinak, ordea, era askoz isolatuagoan kontsumitu ziren. *T. pityocampa* izurritea kontsideratzen da laginketa eremuko pinudietan (López Pantoja eta Carrasco Gotarredona, 1996), beraz sits honen kontsumo handia une horretako eskuragarritasunarekin lotuta egon daiteke.

1. irudia. Saguzar-espezie bakoitzaren gorotzetan identifikatutako harrapakin ordenen agerpen-maiztasunak, ehunekotan.



H. savii-ren laginetan 46 taxon identifikatu genituen: 25 lepidoptero, 8 koleptero, 5 diptero, 5 hemiptero, 2 neuroptero eta trikoptero bakarra. *H. savii*-ren kasuan, harrapakin kontsumituena sitsak izan arren (1. irudia), espezie ohikoena *Myrrha octodecimguttata* marigorringo-espezia izan zen, %35eko agerpen-maiztasuna aurkeztu zuelarik. Belarrihandiarekin erkatuta *H. savii*-k ez du lepidopteroekiko horrenbesteko dependentzia erakutsi, eta diptero, koleptero eta hemipteroek garrantzi handiagoa hartu dute (1. irudia). Horrez gain, dieta dibertsoagoa adierazi zuten (*H. savii*: espezie-aberastasuna = 46; *P. austriacus*: espezie-aberastasuna = 33).

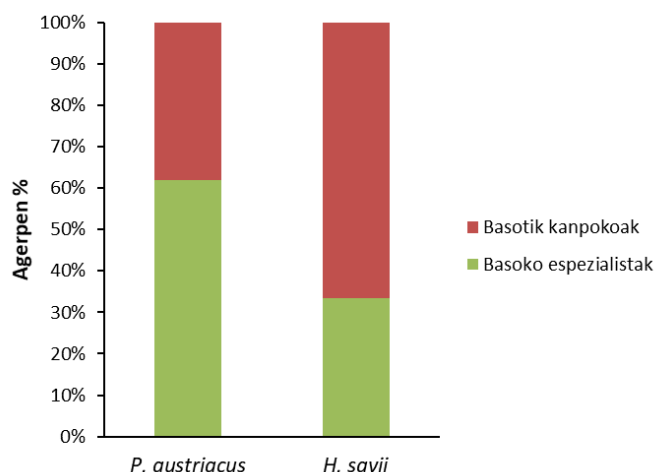
Bi espezieen arteko dietaren gainjartzea baloratzeko Piankaren nitxoaren gainezarpen-indizea (Pianka, 1973) erabili genuen, eta Rko EcoSimR paketea (Gotelli et al., 2015) erabiliz, behatutako indizearen balioa ausazko eredu nulu batekin konparatu genuen. Behatutako Piankaren indizearen

¹ www.boldsystems.org

balioa zoriz esperotakoa baino baxuagoa izan zen bi saguzar-espezieak konparatu ezkerre ($O_{jk} = 0,026$; $p < 0,001$), nitxoaren gainjartze txikia adieraztean duena. Guztira, 4 harrapakin espezie agertu ziren bi saguzar-espezieen dietan: *Arhopalus fesus*, *Endotricha flammealis*, *Epinotia thapsiana* eta *Idaea mustelata*. Lehenengo biek *P. austriacus*-en laginetan %10eko agerpen-maiztasuna gainditu zuten, nahiko ohikoak dira beraz; baina *H. savii* bakarrean identifikatu genituen. *Epinotia thapsiana* bi *P. austriacus*-etan eta *H. savii* bakarrean identifikatu genuen; eta *Idaea mustelata*, azkenik, espezie bakoitzeko saguzar bakar batetan. Bestalde, espezieen arteko gainjartze balioek espezie-barneko gainjartzeekiko kontraste handia dute. *Plecotus austriacus*-en kasuan espezie barneko gainjartze balioak esperotakoak baino altuagoak ziren ($O_{jk} = 0,6399$; $p = 0,001$), seguruenik pinu-beldarraren kontsumo ugaria dela eta. *Hypsugo savii*-ren kasuan, ez zegoen ezberdintasun esanguratsurik behatutako eta esperotako gainjartze balioen artean ($O_{jk}=0,2622$; $p=0,332$).

Iturri bibliografikoak (Sterling eta Parsons, 2012; Arrizabalaga, 2016) eta sareko datu-baseak² erabilita identifikatutako harrapakinei buruzko informazioa bildu genuen. Hasteko, harrapakin guztiak bi kategoriatan sailkatu genituen habitataren arabera: basoetako espezialistak eta basotik kanpoko habitatetan ohikoagoak direnak. *P. austriacus*-en gorotzetan identifikatutako 33 taxonetatik, 12 basoko espezialista gisa agertzen dira bibliografian. *H. savii*-ren kasuan, identifikatutako 46 taxonetik 13 dira basokoak. (2. irudia). Harrapakin hauen banaketa bi saguzar-espezieen artean Chi karratuaren frogaren bitartez aztertu genuen, eta ondorioztatu genuen bi saguzar-espezieen artean habitataren banaketa zorizkoa ez zela (Chi karratua = 13,957; askatasun-gradua = 1; $p = 0,00019$).

2. irudia. Harrapakin espezieei buruz bildutako informazioa. Bi saguzar-espezieen dieta harrapakinen habitat ohikoenaren arabera.



Orokorrean, *P. austriacus*-ek basoko baliabideak gehiago ustiatu zituen *H. savii*-k baino; izan ere, pinu-beldarrarekin batera, maiztasun handiena erakutsi zuten lau harrapakin-espezieak basoetako espezialistak ziren (*T. pityocampa*, *E. flammealis*, *Rhyacionia buoliana* eta *A. fesus*). *P. austriacus*, genero bereko beste saguzar-espezieak bezala, landaredia itxiko eremuetan ehizatza moldatutako harraparia da (Norberg eta Rayner, 1987). Hala ere, saguzar-espezie honek malgutasuna erakusten du, *Plecotus* generoko beste saguzar batzuk ez bezala, eskura dauden baliabideen arabera eremu irekiagoak ere ustiatzen dituelako (Razgour et al., 2012).

Bestalde, nahiz eta *H. savii* eremu irekietako ehiztari gisa definitu (Dorado-Correa et al., 2013), basoetako espezialistak diren intsektuak ere kontsumitu zituen, *P. austriacus*-ek bezain beste ez bada ere. Harrapakin hauek basotik kanpo edo basoaren ertzean ehizatu izana ere posible da, bere ezaugarri

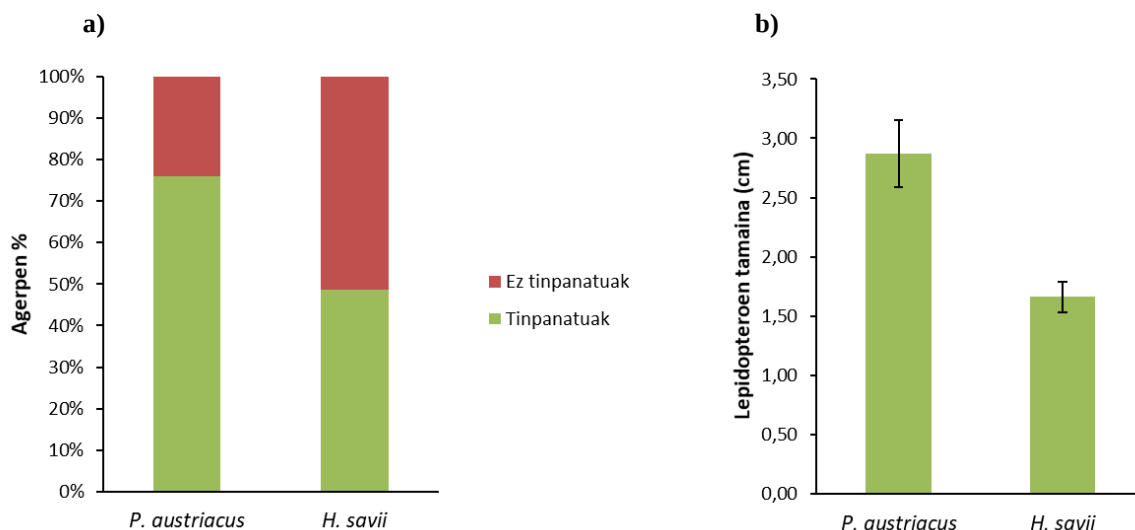
² www.lepidotera.eu

ekomorfologikoekin bat egingo lukeena. Nahiz eta basoetako espezie batzuk kontsumitu, *H. savii*-ren laginetan ez da pinu-beldarrik identifikatu, hau *P. austriacus*-en laginetan oso ohikoa izan den arren.

Horrez gain, *H. savii*-k aberastasun handiko dieta erakutsi du, bai espezie-mailan, eta baita harrapakinen ordena-mailan ere. Gainera, lehen aipatu bezala, ez genuen ezberdintasun esanguratsurik somatu behatutako eta esperotako gainjartze balioen artean. Honek ehiza jokamoldearen moldagarritasun handia iradokitzen du. *H. savii*-ren dieta teknika morfologikoak erabiliz aztertu da soilik, eta modu honetan ere, aldakortasun handia sumatu da harrapakinen ordenatan ikerketa batetik bestera (Whitaker eta Karataş, 2009). Orokorrean ehiztari generalista gisa definitu da, bere dieta eskuragarri dauden baliabidetara moldatzeko gaitasun handia erakusten duelarik.

Bestalde, ekokokapenaren ezaugarriek saguzar-espezie bakoitzak kontsumitutako harrapakinetan eragina izan dezakete, bereziki sitsei dagokiola. Saguzarrak milioika urtez izan dira sitsen harrapariak; ondorioz, Noctuidae, Geometridae, Crambidae edota Pyralidae familiako sitsak gai dira saguzarren ekokokapen-deiak entzuteko, ihes egiteko aukera ematen diena (ter Hofstede eta Ratcliffe, 2016). Gure bi saguzar-espezieen artean, *P. austriacus*-en laginetan sitsen proportzioa handiagoa izan zen, eta familia hauetako espezie ugari detektatu ziren (1. eta 3a. irudiak). Intentsitate oso baxuko deiak erabiltzen ditu; honi esker, sitsak harrapatu ditzake hauek ihes egin baino lehen (Alberdi et al., 2012).

3. irudia. Identifikatutako lepidoptero espezieen inguruan bildutako informazioa. a) Bi saguzar-espezieen dietan identifikatutako sitsak, saguzarren ekokokapena entzuteko ahalmenaren arabera banatuta. b) Bi saguzar-espezieen dieta osatzen duten lepidopteroen tamaina zentimetrotan: bataz-bestekoa eta errore estandarra.



Ez hori bakarrik, tamaina handiagoko lepidopteroek entzumen hobia dute (ter Hofstede eta Ratcliffe, 2016); beraz, *P. austriacus*-en ekokokapen-estrategia berezia sits handiagoak harrapatzerako orduan abantailatsua izan daiteke. Aurreikuspen hau betetzen den frogatzeko bi saguzar espezieek kontsumitutako lepidopteroen hego-zabalerari buruzko informazioa bildu, eta Mann-Whitney test ez-parametrikoa erabiliz konparatu genuen. *P. austriacus*-ek lepidoptero esanguratsuki handiagoak kontsumitu zituen (M.W.ren $U = 85,5$; $p = 0,00001$; irudia).

4. Ondorioak

Emaitzak erakusten dutenez, harrapakinen gainezarpenera txikia da aztertutako *Plecotus austriacus* eta *Hypsugo savii*-ren populazio sinpatrikoen artean. Mota honetako baliabideen partiketa beste saguzar intsektiboroen kasuan ere behatu da, eta hainbat faktorek baldintzatua egon daiteke, hala nola espazioaren banaketa, denboraren banaketa, habitataren erabilera edota janariaren ezaugarriak

(Schoener, 1974). Gure kasuan, emaitzek iradokitzen dute behatutako harrapakinen gainezarpen txikia saguzarren ezaugarri ekomorfologikoekin erlazionatuta dagoela. Alde batetik, bi saguzar-espezie hauen ezaugarri ekomorfologiko ezberdinak direla eta, habitata era ezberdinetan erabiltzea da probableena (Norberg eta Rayner, 1987). Ildo honetan, emaitzek erakutsi dute *P. austriacus*-ek gehiago kontsumitu zituela basoetako harrapakinak *H. savii*-k baino. Gainera, saguzar belarrihandien ekokokapen bereziari esker, *P. austriacus* gai da lepidoptero ugari, eta tamaina handiagokoak, ehizatzeke. *H. savii*-k ordea, dieta aldakorragoa erakusten du, seguruenik ingurumeneko baldintzen arabera moldagarriagoa dena. Baliabideen partiketa honek, gainera, eredu ekologiko orokorraren alde egiten du eta bi espezieen arteko koexistentzia errazten du (Stephens eta Krebs, 1986).

5. Etorkizunerako planteatzen den norabidea

Teknika molekularrek harrapari generalisten dietaren inguruko ikerketetan aurrerapen garrantzitsua suposatu dute, sare trofiko konplexuen azterketa ahalbidetzen dutelako. Ezagutza hau ezinbestekoa da kontserbazioaren ikuspuntutik, espezie baten zaurgarritasuna baloratzeko bere nitxoaren ezagutza sakona behar baita (Clare, 2014). Gaur egun, saguzarrak interes bereziko espezie gisa konsideratzen dira, beraz haien inguruko ezagutza handitzea eta ezinbestekoa da era egokian kontserbatu ahal izateko.

Ildo honetan, lan hau, *H. savii*-ren dieta aztertzeke teknika molekularrak erabili dituen lehena izan da. Emaitzek erakutsitako aberastasuna eta moldagarritasuna kontutan hartuta, interesgarria litzateke espezie honen inguruko nitxo trofikoaren azterketa gehiago burutzea, hainbat kanpo faktorek; hala nola habitataren ezaugarriak, lurraren erabilera, edota beste saguzar edo antzeko harrapariren presentziak *H. savii*-ren ehizamoldean izan dezaketen eragina baloratzeko.

Bestalde, *P. austriacus*-ek pinu-beldarrarekiko zaletasun handia erakutsi du, ikerketa eremuan izurrite garrantzitsua dena. Saguzar-izurrite elkarrekintza guk behatutako adibidetik haratago doa, izurriteen kontsumoa hainbat saguzar-espezieetan deskribatu da eta (Kunz, 2011). Hala ere, ikerketa ugari behar dira oraindik mota honetako elkarrekintzaren inguruko ezagutza fintzeko, baina etorkizunean saguzarrak pestiziden ordeztatu izurriteen kontrol biologiko gisa erabiltzeko behar dugun informazioa eman diezagukete.

6. Erreferentziak

- Alberdi, A., Garin, I., Aizpurua, O. eta Aihartza, J. (2012). The foraging ecology of the Mountain Long-Eared Bat *Plecotus macrobullaris* revealed with DNA Mini-Barcodes. *Plos ONE*. 7, e35692.
- Arrizabalaga, A. (2016). Foraging Ecology of *Rhinolophus euryale* unveiled by DNA metabarcoding. PhD Thesis. UPV/EHU.
- Bogdanowicz, W., Fenton, M. B., eta Daleszczyk, K. (1999). The relationships between echolocation calls, morphology and diet in insectivorous bats. *Journal of Zoology*. 247, 381-393.
- Clare, E. L. (2014). Molecular detection of trophic interactions: emerging trends, distinct advantages, significant considerations and conservation applications. *Evolutionary Applications*. 7, 1144-1157.
- Dietrich, S., Szameitat, D. P., Kiefer, A., Schnitzler, H., eta Denzinger, A. (2006). Echolocation signals of the plecotine bat, *Plecotus macrobullaris* Kuzynkin, 1965. *Acta Chiropterologica*. 8(2): 465-475.
- Dorado-Correa, A. M., Goerlitz, H. R., eta Siemers, B. M. (2013). Interspecific acoustic recognition in two European bat communities. *Frontiers in Physiology*. 4, 192.
- Emrich, M. A., Clare, E. L., Symondson, W. O. C., Koenig, S. E., eta Fenton, M. B. (2014). Resource partitioning by insectivorous bats in Jamaica. *Molecular Ecology*. 23, 3648-3656.

- Gotelli, N. J., Hart, E. M. eta Ellison A. M. (2015). EcoSimR: Null model analysis for ecological data. R package version 0.1.0. <http://github.com/gotellilab/EcoSimR> DOI: 10.5281/zenodo.16522
- Kunz, T. H., Braun de Torrez, E. , Bauer, D. , Lobova, T. eta Fleming, T. H. 2011, Ecosystem services provided by bats. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1223: 1-38.
- López Pantoja, G., eta Carrasco Gotarredona (1996). Estudio comparativo de la ecología de la procesionaria del pino (*Thaumetopoea pityocampa* schiff.) en el parque natural de Doñana y P.N. Cazorla Segura y las Villas. 221-225.
- Norberg, U. M., eta Rayner, J. M. V. (1987). Ecological Morphology and Flight in Bats (Mammalia; Chiroptera): Wing Adaptations, Flight Performance, Foraging Strategy and Echolocation. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Science*. 316, 335-427.
- Pianka, E. R. (1973). The structure of lizard communities. *Annual Review of Ecology and Systematics*. 4, 53-74.
- Razgour, O., Clare, E. L., Zeale, M. R. K., Hanmer, J., Schnell, I. B., Rasmussen, M., Gilbert, T. P., eta Jones, G. (201e). High-throughput sequencing offers insight into mechanisms of resource partitioning in cryptic bat species. *Ecology and Evolution*. 1, 556-570.
- Shoener, T. W. (1974). Resource partitioning in ecological communities. *Science*. 185,27-39.
- Stephens, D. W., eta Krebs, J. R. (1986). *Foraging Theory*. Princeton University Press, Princeton.
- Sterling, P. eta Parsons, M., (2012). *Field Guide to the Micro Moths of Great Britain and Ireland*. British Wildlife Publishing Ltd., Dorset.
- ter Hofstede, H. M. eta Ratcliffe, J. M. (2016). Evolutionary escalation: the bat-moth arms race. *Journal of Experimental Biology*. 219, 1589-1602.
- Whitaker, J. O. eta Karataş, A. (2009). Food and feeding habits of some bats from Turkey. *Acta Chiropterologica*. 11(1): 393-403.
- Zha, Y., Chen, Q. eta Lei, C. (2009). Ultrasonic hearing in moths. *Annales de la Société entomologique de France (N.S.)*. 45, 145-156.
- Zingg, P. E. (1988). Search calls of echolocating *Nyctalus leisleri* and *Pipistrellus savii* (Mammalia: Chiroptera) recorded in Switzerland. *Zeitschrift für Saugetierkunde*. 53: 281-293.

7. Eskerrak eta oharrak

Lan hau Zientzia eta Berrikuntza Ministeritzako GLC2012-38610 eta CGL2015-69069-P, eta Eusko Jaurlaritzako IT754-13 proiektuen buruan burutu da. Esker bereziak Doñanako Estazio Biologikoko Carlos Ibañez eta Jesus Nogueras-i, lan honetan erabilitako laginak jasotzeagatik., Eskerrak EHU eta Zientzia eta Teknologia Fakultateari. Azkenik, eskerrak Jokabidearen Ekologia eta Eboluzioa taldeko guztiei, bereiziki Aitor Arrizabalagari laborategian egin zuen lan guztiagatik, eta Inazio Garini lana zuzentzeagatik eta eskainitako laguntza guztiagatik.

Konpostajearen ahalmena *Crocosmia x crocosmiflora* (Lemoine)ren propaguluak desbitalizatzeko

Etxeberria, Iñaki¹; Izurzu, Gorka A.¹; Arizmendiarieta, Joseba S.^{1,2,3} eta Irigoien, Natxo^{1,3}

¹Agronomia, Bioteknologia eta Elikadura. Nafarroako Unibertsitate Publikoa

²Luar Ingurumena Aholkularitza. Leitza (Nafarroa), ³Fertile Auro. Elkarte

Profesionala natxo.irigoien@unavarra.es

Laburpena.

Azkeneko urte hauetan, *Crocosmia x Crocosmiflora* L. izeneko landare inbasorea Euskal Herriko kostaldea erasaten ari da. Tokiko agintarientzako landare inbasore honen hondakin organikoak kudeatzea erronka bilakatu da. Lan honetan, irtenbide gisa, konpostaren ekoizpena planteatzen da. Hori dela eta, landare honen ugaltze organoak (kormo edo erraboilak) desbitalizatzeko konpostaren ahalmena ebaluatu da. Ikerketan ondorioztatzen denaren arabera, konpostak 60°Cko temperatura modu homogeenan lortzean erraboilak guztiak deuseztatzen dira. Zenbait kasutan baldintza horiek lortzea zaila denez, zenbait estrategia eta aholku gomendatzen dira segurtasunez jokatzeko.

Hitz gakoak: Konposta, Desbitalizatzeta, Landare inbasoreak, *Crocosmia x Crocosmiflora*, Kormo.

Abstract

In recent years, an invasive plant called Crocosmia x Crocosmiflora L. is affecting the coast of the Basque Country. For local authorities it has become a challenge to manage the organic remains of this weed. In this research work, the production of compost is proposed as a solution. Therefore the capacity of the compost to devitalize the reproductive organs (corms) of this invasive plant has been evaluated. The investigation concludes that if the compost reaches 60°C of temperature, all the corms are inactivated. However, achieving this conditions, sometimes is difficult, therefore some strategies and tips are proposed in order to avoid the dissemination of this weed.

Keywords: Compost, Desvitalize, Invasive plants, *Crocosmia x Crocosmiflora*, Corms.

1. Sarrera eta motibazioa

Jakina denez, azkeneko urte hauetan Euskal Herriko kostaldean, Frantziatik etorruta, *Crocosmia x Crocosmiflora* (Lemoine) N. E. Br. [Iridaceae] izeneko landare inbasoreak agertzen ari dira. Tokiko agintariak espezie horren kontrolik gabeko ugaltzeaz arduratuta daude, lehiakide handia izan baitaiteke bertako florarentzako. Beste alde batetik, Ekonomia Zirkularraren ildoari jarraituz, Euskal Herrian gero eta konpostatze sistema gehiago ezartzen ari dira. Hori dela eta, landare inbasore honen hondakinak kudeatzeko konpostatzea ze neurritan den metodo egokia aztertu behar da.

Gaur egun belar txarrek nekazaritza eta ingurugiroan eragin handia daukate eta arazo handi bat bezala planteatzen dira. XX. mendearen erdialdean, arazo honi konponbidea emateko, herbizida kimikoak garatu ziren (PAN Europe, 2018). Tamalez, hauek ekarriko zituzten ondorio larriak ez ziren kontuan hartu. Alde batetik, herbizida sintetikoek elikagaien ekoizpena handitzen lagundu dute, baina, beste aldetik, ingurugiroan, baliabide naturaletan eta giza osasunean ondorio negatiboak eragin dituzte (PAN Europe, 2018).

Herbizida kimikoen erabilpenak eragin negatibo asko ditu: adibidez, ibaien kontaminazioa edo biodibertsitatearen suntsitzea. Baina, seguruenik, arazorik larriena belar

txar horiek sortzen duten erresistentzia da (Belaise et al., 2010). Belar txarrak gero eta erresistenteagoak dira, eta horrek amaierarik gabeko arazo batera eramaten gaitu. Guzti horri munduaren globalizazioa eta hedapen modu berriak gehitu behar zaizkio.

Bestalde, Europar Batasunak, ekonomian sistema linealaren gainbehera ikusita, Ekonomia Zirkularren alde egin du. “Horizon 2020” izeneko EBko ikerketa eta berrikuntza finantzazio programan, ekonomia jasangarriago bat lortzeko plan eta neurri ugari proposatu ditu, horien artean gai organikoaren konpostatzea bultzatzea (European Commission, 2017). Horrela gai organikoaren bizi-zikloa ixten da berrerabilpena eta birziklapenaren bitartez, eta eragin positiboak sortzen dira, bai ingurugiroan eta bai ekonomian (Hoornweg & Otten, 1999). Testuinguru honetan argitu behar da ze gaitasuna duen konpostajeak belar txar honen ugaltze organoak suntsitzeko.

2. Arloko egoera eta ikerketaren helburuak

2.1. Aurrekariak

Esan beharra dago ez dagoela konpostaren tenperaturak kormoen desbitalizazioan ze eragin duen aztertzen duen bibliografiarik: horrelako lanak ugariagoak diren beste zenbait belar txarren haziekin bakarrik egin dira. Esaterako, Gallart et al 2012, frogatu zutenenez *Digitaria Sanguinalis* eta *Echinochloa Crus-galli* haziek germinazio txikia izaten dute (<3%) konpostajea 55°C tenperatura lortzen denean.

Bestelakoak ere badaude: 1999an Floridako Unibertsitateko Nekazaritza eta Elikadura institutuak konposta eta belar txarren inguruan ikerketa bat egin zuen. Ikerketa horretan 14 landare inbasore heldutasun desberdineko konpostetan sartu ziren eta ondoren landare inbasore bakoitzaren germinazio portzentajea aztertu zen. Emaizten arabera 8 asteko konpostean sartutako 14 espezieetatik 13k germinazio tasa dezente jaitsi zuten, baina ez erabat (Ozores-Hampton et al., 1999).

2.2. Helburuak

Helburua konpostaren ahalmena testatzea da *Crocoshia* x *Crocoshia*floraren propaguluak desbitalizatzeko. Era berean, *Crocoshia* x *Crocoshia*flora landarearen eta bere propaguluen erresistentzia aztertuko da, ingurumen baldintza (tenperatura) desberdinetan.

3. Ikerketaren muina

3.1. Propaguluen kontserbazioa eta landarearen erresistentzia entseguak

Crocoshia x *Crocoshia*floraren propaguluen kontserbazioa testatzeko, tamaina diferenteko kormo tenperatura desberdinetan (3°C, 18°C eta aldakorra) hilabete batez biltegitatu ziren. Biltegitatutako kormoak bandeja desberdinetan erein ziren bai negutegian eta bai Fitotroneatan. 42 eta 100 egun ondoren germinazio portzentajea aztertu zen.

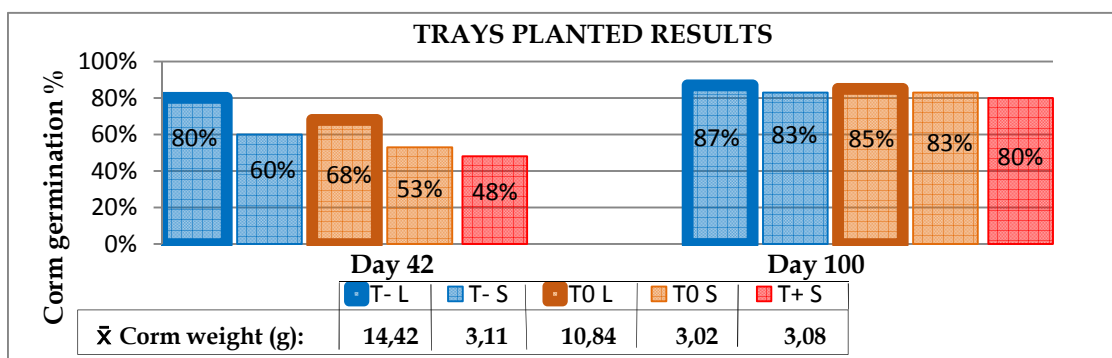
1. taula. Ereindutako bandeja bakoitzaren ezaugarriak.

TRAYS TYPES	STORAGE	SUBSTRATE TYPES	NUMBER OF CORMS	SIZE DIAMETER	TOTAL WEIGHT (g)	$\bar{x}$ WEIGHT / CORM (g)	GERMINATION TEST
1 T-L	T-	A	40	> 2 cm	576,7	14,42	N,FT
2 T-S	T-	A	40	< 2 cm	124,5	3,11	N,FT
3 T ₀ L	T ₀	A	40	> 2 cm	433,5	10,84	N,FT
4 T ₀ S	T ₀	A	40	< 2 cm	120,7	3,02	N,FT
5 T+T	T+	B	40	< 2cm	123,3	3,08	FT

- T-: Cold (2 °C), T₀: Outdoor (Variable), T+ (18°C) : Hot - N: Greenhouse, FT: Fitotron

- S: Small corm, H: Large corm - A: Turba/perlita 50 %, B:Berrerabilitako substratua Turba/perlita 95/5%

1. grafika. Ereindutako bandeja bakoitzean lortutako germinazioa



Beste alde batetik C.× Crocosmiiflora landarearen erresistentzia testatzeko T-L bandejatik germinatutako landare batzuk Fitotroian mantendu ziren eta beste batzuk aire librea eraman ziren. Aire librean utzitako landareak ez ziren ureztatu, Fitotroikoak, berriz, bai. Hilabete bat igaro ondoren, Fitotroiko landareak hazita zeuden. Aire librekoak, berriz, lehortuta baina bizirik zeuden, nahiz eta gaueko tenperaturak zero azpikoak izan 8 gauetan.

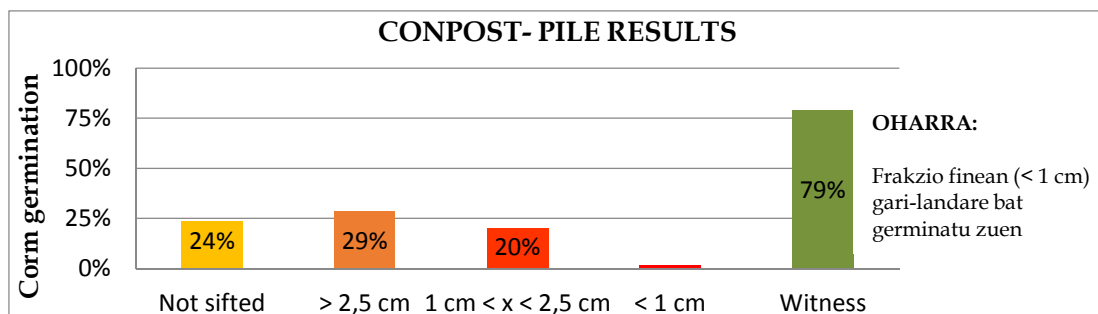
3.2. Propaguluaren desbitalizazio entsegua konpost-pilan

Konpostatze prozesua C.× Crocosmiifloraren propaguluak desbitalizatzeko gai den edo ez aztertzeko, 2018ko urriaren 5ean 4 m³ ko konpost-pila bat egin zen. Konpost-pila hori sortzeko C.× Crocosmiiflora landareak erabili ziren (1,5 m³) eta baita hilabete bat lehenago oso intentsiboki konpostazen egondako sukaldeko bio-hondakinak eta inausketa hondakinak ere. Abenduan kribatu zen: material errefusatu (> 2,5 cm), frakzio ertaina deiturikoa (1 cm < x < 2,5 cm) eta frakzio fina (< 1 cm). Frakzio bakoitzetik 5 l-ko konpost lagin bat hartu zen eta ateratako kormo kantitatea neurtu zen. Gero kormo horiek germinatzen jarri ziren desbitalizatuak zeuden edo ez ikusteko. Tenperatura neurketak egunero egiten ziren.

2. taula. Kribatze prozesuaren ondoren lortutako emaitzak

COMPOST TYPE	COMPOST SIEVE PERFORMANCE (%)	CORM NUMBER ON 5L SAMPLE
Not sifted	0	38
> 2,5 cm	% 25	59
1 cm > x < 2,5 cm	% 25	30
< 1 cm	% 50	0

2. grafika. Emaitzak Kormoen germinazio portzentajea



3.3. Propaguluaren desbitalizazio entsegua konpost komunitarioan

NUPko instalazioetan C.× Crocosmiifloraren propaguluak tamainaz sailkatuta eta ingurumen baldintza desberdinetan biltegitratuta zeuden (ikusi 1. Taula). Kormo hauek

poltsa porotsu sintetikoetan sartu ziren. Ondoren, poltsa hauek Iruñeko Sanduzelaiko auzo-konpostagailuetan sartu ziren, 20 cm-ko sakoneran.

3. taula. Sanduzelaiko konpostagune komunitarioan sartu beharreko poltsa motak eta kopurua.

BAG TYPES	BAG NUMBER	STORAGE	SIZE DIAMETER	CORN NUMBER/BAG
1 T-L	24	T-	> 2 cm	12
2 T-S	24	T-	< 2 cm	20
3 T+L	24	T+	> 2 cm	12
4 T+S	24	T+	< 2 cm	20
GUZTIRA: 96				

Entsegu honetan 2 konpostagailu desberdin erabili ziren, bata aktibitate gutxikoa (Mad deiturikoa), eta bestea oso aktiboa zena (Act deiturikoa). Konpostagailu bakoitzean 48 poltsa sartu ziren. Konpostagailu bakoitzean zeuden 48 horietatik, 24 konpostagailu nukleoan (N) sartu ziren eta beste 24 periferian (P). Nukleoan zeuden 24 horietatik 12-k konpostagailuren barruan hilabete batez (1) iraungo zuten eta beste 12 k hiru hilabetez (3). Periferiakoein berdina gertatzen da, 24 horietatik 12-k, konpostagailuaren barruan hilabete batez (1) iraungo zuten eta beste 12 k hiru hilabetez (3). Poltsa motei dagokionez, 12 poltsa horietatik, 3 T-L motakoak izango ziren, beste 3 T-S motakoak, beste 3 T+L motakoak eta beste 3 T+S motakoak. Bestalde, lana errazteko, poltsak launaka sartuko ziren tipula zorroan. Zorro bakoitzak mota bakoitzeko poltsa bat zuen.

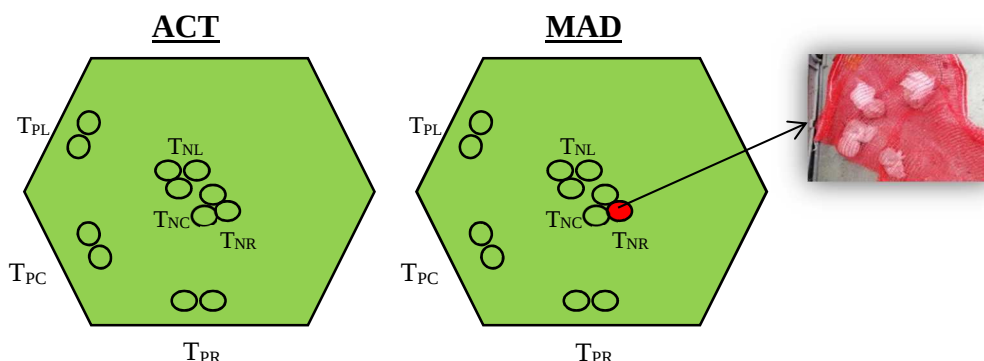
4. taula. Tipula zorroen kodifikazioa eta kantitatea.

Tipula zorroen kodifikazioa		Tipula zorroen Kodifikazioa	
a1	Act-I-NL-1mes	a11	Act-I-NL-3mes
a2	Act-II-NC-1mes	a12	Act-II-NC-3mes
a3	Act-III-NR-1mes	a13	Act-III-NR-3mes
a4	Act-I-PL-1mes	a14	Act-I-PL-3mes
a5	Act-II-PC-1mes	a15	Act-II-PC-3mes
a6	Act-III-PR-1mes	a16	Act-III-PR-3mes
m1	Mad-I-NL-1mes	m11	Mad-I-NL-3mes
m2	Mad-II-NC-1mes	m12	Mad-II-NC-3mes
m3	Mad-III-NR-1mes	m13	Mad-III-NR-3mes
m4	Mad-I-PL-1mes	m14	Mad-I-PL-3mes
m5	Mad-II-PC-1mes	m15	Mad-II-PC-3mes
m6	Mad-III-PR-1mes	m16	Mad-III-PR-3mes

Composter	Repetition	Place		Time
1 Act (High)	I, II, III	N (Nukleo/Center)	L (Left)	1, 3 Month
6 Mad (Low)		P (Periferia/Side)	C(Center) R (Right)	

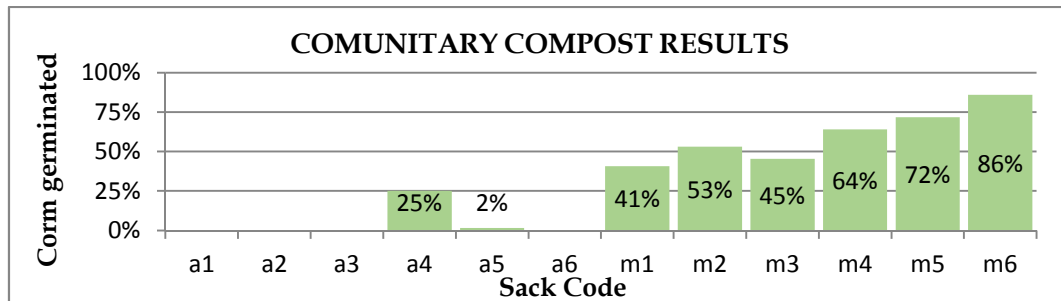
*3 hilabetezko tipula zorroen emaitzak ez dira lan honetan jorratuko

3. grafika. Tipula zorroen antolamendu fisikoa



Hilabete bat igaro ondoren hilabete betetako tipula zorroak atera ziren eta kormoak germinatzen jarri ziren. Tenperaturak bi egunetan behin neurtu ziren.

4. grafika. Emaitzak Kormoen germinazio portzentajea



4. Ondorioak

- *Crocoshia x Crocosmii* floraren erresistentzia
 - Propaguluek 3°C-ko tenperaturak jasan dituzte hilabete osoan zehar, inongo minik jaso gabe. Landareen parte begetatiboari dagokionez, 8 egunez 0 °C azpiko tenperatura minimoak pairatu dituzte eta hala ere bizirik mantendu dira. Azpimarratzekoa da bere kormo germinazio tasa altua, ingurugiro baldintza idealetan % 80 ingurukoa. Propaguluaren tamainari dagokionez, tamaina ez da germinazio tasa altuago batekin erlazionatzen, baina bai erlazionatzen da germinazio azkartasunarekin.
- *Konpostajearen ahalmena Crocoshia x Crocosmii* floraren propaguluak desbitalizatze
 - Propagulu guztiek 50-60°C-ko tenperaturak jasotzen baldin badituzte, teoriarik metodoa ehuneko ehuneko efektiboa izango da. Dena den, praktikan oso zaila da kormoen ehuneko ehuna desbitalizatzea hilabete bateko prozesuan. Jarraipen tekniko zorrotza egin ezean, 50-60°C-ko tenperatura masa osoan ez lortzeko arriskua dago, eta honen ondorioz materialean dauden propagulu guztiak ez desbitalizatze.
 - Lan honetan egindako konpost pila entseguko emaitzek (% 60-70-ko kormo desbitalizazioa), konpost pila sistemetan bereziki, jarraipen tekniko egitea erabat gomendagarria dela erakusten dute. Sistema hauetan maneiatzen den bolumena handiagoa da eta, beraz, zailagoa masa osoan tenperatura homogeneoak lortzea. Sanduzelaiko auzo-konpostagailuetan kormoen germinazio tasa kormoen kokapena eta konpost motarekin erlazionatuta dagoela ondorioztatu da. Kormo desbitalizazioa beti handiagoa izango da konpostaren nukleoan eta konpostagailu aktibo batean. Hau logikoa da, nukleoan eta konpostagailu aktiboetan beti tenperatura altuagoa baita. Bestalde, berretsi da kormoen tamaina eta kontserbazio modua (biltegiatze mota) ez dagoela germinazio tasarekin erlazionatuta.
- *Konpost erabilgarri bat lortzeko eta Crocosmii*aren barreiatzea ekiditeko aholkuak
 - Ikusi denez, zaila izan daiteke landare honen propagulu guztiak desbitalizatzea konpostajea oso ongi egiten ez bada. Horregatik, zenbait aholku edo ekintza osagarria gomendatzen dira.
 - o Crocosmia landareak prozesuaren hasierako faseetan bakarrik gehitu, fase termofiloan daudelarik tenperatura oso altuak jasoko dituztela ziurtatzeko.
 - o Fase termofiloan iraulketa periodikoak egin, masa osoak tenperatura altuak jasango dituela ziurtatzeko.

- o Konposta kribatu: galbahearen zuloak gehienez cm batekoa izan behar du. Horrela iragazkitik kormoak ez direla pasako ziurtatzen da. Material errefusatua beste konpostatze baterako berrerabili behar da.
- ❖ Homogeneoki tenperatura altuak (> 60 °C) lortzen baldin badira eta gomendatutako ekintzak egiten baldin badira, konpostaren bitartez landare hau barreiatzea ia ezinezkoa izango da.

5. Etorkizunerako planteatutako norabidea

Lantzen den gairen garrantzia ikusita eta ateratako ondorioak berresteko, beharrezkoa da froga gehiago egitea. *Crocoshia* x *Crocoshia* landare ezezaguna da eta komenigarria izango litzateke kormoen eta landarearen erresistentzian ezagutza handitzea. Horretarako kormoak eta landareak ingurumen baldintza desberdinetan jarri beharko lirateke (tenperatura oso baxuak, altuak, hezetasuna, lehortea, substratu diferenteak, denbora luzez biltegitatuta izan...). Bestalde, konpostaren kormo-desbitalizazio ahalmenari dagokionez, ondo legoke 60 °C-ko tenperatura muga hori beste entsegu batzuekin berrestea. Tenperaturaren eta kormoen desbitalizazioaren arteko erlazioan oraindik ere gehiago sakondu daiteke. Lan honetan tenperatura maximoak soilik erlazionatu dira desbitalizazioarekin. Interesgarria izango litzateke jakitea nola eragiten duen denbora luzez tenperatura baxuak (< 60 °C) kormoen desbitalizazioan.

6. Erreferentziak

- Belaise, C., Tomba, E., Offidani, E., Visani, D., Ottolini, F., Bravi, A., ... Fava, G. A. (2010). La Well-Being Therapy e le tecniche di gestione dell'ansia in ambito scolastico: Quali differenze? *Rivista Di Psichiatria*, 45(5), 290–301. <https://doi.org/10.1614/WT-D-12-00109.1>
- European Commission. (2017). Report from the commission to the european parliament, the council, the european economic and social committee and the committee of the regions. *Official Journal of the European Union*, COM(2017)(33), 1–14. https://doi.org/http://ec.europa.eu/environment/circular_economy/implementation_report.pdf (accessed on Feb 12, 2018)
- Gallart, M., M., L., Huerta, O., Duarte, S., A., & M., M.-F. (2012). Efecto del compostaje en la germinación de semillas de *Digitaria sanguinalis* y *Echinochloa crus-galli*, 5, 375–381.
- Hoornweg, D., & Otten, L. (1999). Composting and Its Applicability in Developing Countries. *World*, 6(1), 2010–2010.
- Ozores-Hampton, M., Stoffella, P. J., Bewick, T. A., Cantliffe, D. J., Obreza, T., & Bewick, T. A. (1999). Effect of Age of Cocomposted MSW And Biosolids on Weed Seed Germination. *Compost Science and Utilization*, 7(1), 51–57. <https://doi.org/10.1080/1065657X.1999.10701952>
- PAN Europe. (2018). Alternatives to herbicide use in weed management-The case of glyphosate. Retrieved from www.pan-europe.info

7. Eskerrak eta oharrak

Lan hau gauzatzeko oinarrizkoa izan da erakunde eta pertsona askoren borondate ona eta inplikazioa: Hernaniko Udala, Aranzadi Zientzien Elkarte (Yoana Garcia Mendizabal), Eusko Jaularitza, Luar Ingurumena, Nafarroako Unibertsitate Publikoa eta Iruñeko Sanduzelaiko Auzokideak. Mila esker denei.

Lan hau Landa Garapeneko Europako Nekazaritza Funtsarekin partzialki finantziatu da. 2014-2020 Nafarroako Gobernu Landa Garapeneko Programaren bidez (*Proyecto Piloto de bioeconomía circular de residuos orgánicos a escala local con dimensión social y formativa.*)

Hutsune erako Akatsen Azterketa Ni-Mn-Z (Z = Ga, Sn, In) Aleazioetan

Unzueta Solozabal, Iraultza¹; Zabala Unzalu, Nerea²; Sanchez Alarcos Gomez, Vicente^{3,4};
Recarte Callado, Vicente^{3,4}; Perez de Landazabal, Inaki^{3,4}; Garcia Martinez, Jose Angel¹;
Plazaola Muguruza, Fernando²

¹ Fisika Aplikatua II, Zientzia eta Teknologia Fakultatea, Euskal Herriko Unibertsitatea (UPV/EHU)

² Elektrizitate eta Elektronika, Zientzia eta Teknologia Fakultatea, Euskal Herriko Unibertsitatea (UPV/EHU)

³ Zientzia Departamentua, Nafarroako Unibertsitate Publikoa (UPNA)

⁴ INAMAT Institutua, Nafarroako Unibertsitate Publikoa (UPNA)

iraultza.unzueta@ehu.eus

Laburpena

Positroi-deuseztapen bizidenboren espektroskopiaren bidez eta positroi-bizidenboren kalkulu teorikoen bitartez, $\text{Ni}_{50}\text{Mn}_{50-x}\text{Sn}_x$ ($x = 25, 20, 15, 13, 10$) eta $\text{Ni}_{50}\text{Mn}_{50-x}\text{In}_x$ ($x = 25, 20, 16, 13$) aleazioen hutsune erako akatsak aztertu dira. Ni_2MnGa aleazioan aurretiaz burutu diren ikerketez baliatuz, akats-motaren zehaztapena Ni_2MnGa laginera hedatu da ere. Elektro-positroi kalkuluaren emaitzak eta esperimentalki neurtutako emaitzak alderatuz, aztertutako aleazioetan agertzen den hutsune erako akatsa V_{Ni} dela frogatzen da. Bestalde, elektro-positroi kalkulu zehatzak burutzeko erabili behar den hobekuntza-faktorearen bost parametrizazio ezberdin aztertu dira lan honetan. Guzti horien artean emaitza esperimentalak hobekin aurretik duena zehaztu da.

Hitz gakoak: Hutsuneak, PALS, forma-oroimendun aleazioak, elektro-positroi korrelazioa

Abstract

Vacancy-type defects in $\text{Ni}_{50}\text{Mn}_{50-x}\text{Sn}_x$ ($x = 25, 20, 15, 13, 10$) and $\text{Ni}_{50}\text{Mn}_{50-x}\text{In}_x$ ($x = 25, 20, 16, 13$) alloys are studied by theoretical PALS calculations and experimental measurements. Taking advantage of the existing PALS results for Ni-Mn-Ga systems, the study is extended also to this alloy. By combining the experimental results and electron-positron density functional calculations, V_{Ni} is identified as the most probable vacancy present in all the studied systems. Moreover, the so-called enhancement factor, which acquires a key relevance for a proper lifetime calculations, has been modeled by five different parametrizations, by which the parametrization that best predicts the experimental results is determined.

Keywords: Vacancy, PALS, shape-memory alloys, electron-positron correlation

1. Sarrera eta Motibazioa

$\text{Ni}_2\text{Mn-Z}$ ($Z = \text{Ga, Sn, In}$) Heusler aleazioen propietate multifuntzional anitzak direla eta, konposatu hauek geroz eta arreta handiagoa pizten ari dira materialen zientziaren komunitatean. Aipatzekoak dira forma-oroimendun efektua (Sutou *et al.*, 2004) eta efektu magnetokalorikoa (Krenke *et al.*, 2005). Guzti honen ondorioz, material hauen erabilera geroz eta gehiago ari da hedatzen espintronika, eguzki-zelula eta energia-biltze zein hozte-magnetikoen teknologia-eremuetan (Liu *et al.*, 2012).

Ni-oinarridun Heusler aleazio hauen propietate multifuntzional anitzak transformazio martensitikoarekin (TM) daude zuzenean lotuta. Horrela, aleazioen egitura-oreka zein TM-a baldintzatzen duten parametroen gaineko kontrola ezinbestekoa da material hauen propietate multifuntzionalak doitzeko. Testuinguru honetan TM-aren tenperaturaren (T_{TM}) eta TM-aren propietateen gaineko kontrolak garrantzi berezia hartzen du, T_{TM} -ak finkatzen baitu propietate multifuntzionaletaz baliatzeko edukiko den tenperatura-tartea. Era honetan, T_{TM} -a eta honekin lotutako ezaugarriak dira aplikazioen ikuspuntutik garrantzi handiena hartzen duten parametroak.

2. Arloko Egoera, eta Helburuak

Hala ere, aleazio hauek erakusten dituzten propietate mekaniko eskasen ondorioz, ezaugarri multifuntzionalen eraginkortasuna asko gutxitzen da. Izatez, aleazio hauen hauskortasuna da aplikazio zein gailu praktikoen garapena oztopotzen duen faktorerik erabakigarriena. Horrela, Ni-oinarridun Heusler aleazioetan oinarritutako elementu aktiboen garapenerako bidean, azken hamarkadan, material hauen propietate mekanikoak hobetzea izan da helburu nagusia (Llamazares *et al.*, 2013). Izatez, mikropartikulak eta nanopartikulak elementu aktibo gisa erabiltzearen planteamendua konponbide eraginkor bezala finkatzen ari da azken urteotan (Kumar *et al.*, 2016). Hala ere, nahiz eta Ni-oinarridun Heusler aleazioetan oinarritutako hauts-laginen jokaerak abantaila aipagarriak erakusten dituzten, eskala hauetan, akatsen, dislokazioen, hutsuneen, tokiko esfortzuen eta tentsioen kontrola ezinbestekoa bilakatzen da, hauek TM-an zuzenean eragiten bait dute (Peruman *et al.*, 2011). Horrela, mikroegituraren gainerako kontrolak oraindik eta garrantzi handiagoa hartzen du hauts-laginekin lotutako propietate multifuntzionalak doitzerako orduan.

Testuinguru honetan, ikerketa askok, hutsuneek, Ni-oinarridun Heusler aleazioen propietate magnetiko zein TM-an duten berebiziko garrantzia azpimarratzen dute. Izan ere, Zhang *et al.*-ek 2015 lanean, zinta-formako Ni-Mn-Sn aleazioetan behatutako entropia-aldaketa magnetikoa hutsuneen deuseztapenek eragindako ordena atomikoaren berreskurapenarekin erlazionatzen dute. Bestalde, Kustov *et al.*-ek 2004 lanean, hutsuneek TM-aren finkapenean duten garrantzia azpimarratzen dute. Bestalde, S´anchez-Alarcos *et al.*-ek 2007 lanean eta Santamarta *et al.*-ek 2006 lanean, Ni-Mn-Ga eta Ni-Fe-Ga aleazioetan behatutako Curie-ren temperaturaren eta T_{TM} -ren aldaketak hutsuneen kontzentrazio-aldaketekin erlazionatzen dituzte, hurrenez hurren. Hala ere, aurreko lan guzti hauetan ez da hutsuneen froga esperimentalik aurkeztu eta hutsuneek Ni-oinarridun aleazioen TM-an eta propietate magnetikoetan izan dezaketen eraginaren azterketa, ikuspuntu teorikotik soilik aztertu izan da orain arte (Bai *et al.*, 2010; Kulkova *et al.*, 2008).

Lan honetan, Ni-Mn-In, Ni-Mn-Sn eta Ni-Mn-Ga sistemen hutsune-erako akatsak aztertzen dira Positroi-deuseztapen bizidenboren espektroskopiaren (PALS) teknikaren bidez. Neurketa esperimental guztiak Dentsitate-Funtzionalaren Teorian (DFT) oinarritutako kalkulu teorikoekin alderatzen dira. Gainera, positroiaren presentziak eragiten duen dentsitate elektronikoaren hazkundera modelizatzen duen hobekuntza-faktorearen bost parametrizazio ezberdin aztertu dira. Azkenik, balio teoriko eta esperimentalak konbinatuz, lagin hauetako hutsuneak Ni atomoenak direla zehaztu da.

3. Ikerketaren Muina

3.1. Prozedura Esperimentala

$Ni_{50}Mn_{50-x}Sn_x$ ($x = 25, 20, 15, 13, 10$) eta $Ni_{50}Mn_{50-x}In_x$ ($x = 25, 20, 16, 13$) (Sn_x eta In_x eran izendatutakoak, hurrenez hurren) lingote polikristalinoak purutasun handiko elementuekin sintetizatu dira arkuurtze teknikaren bidez argon atmosfera babeslearekin. Sn_x eta In_x laginak, 1173 K-tara 24 orduz homogeneizatu ondoren, hauen konposizioa EDX-en (Energia-Dispersiozko X-izpien espektroskopia) analisiaren bidez egiaztatu da. Ondoren, Sn_x eta In_x laginak 1173 K-eko tenperaturatik tenplatu dira. Oreka-termikoa ziurtatzeko, laginak 30 minutuz eduki dira tenperatura horretan, eta ondoren 0°C-tara dagoen uretara tenplatu dira (AQ egoera). Hutsuneen eboluzioa, tenplaketaren osteko suberaketa-prozesuekin aztertu da. Tenplatutako laginei, suberaketa-isokronoa deritzon prozesua aplikatzen zaie; laginen tenplaketaren ostean, hauen tenperatura 10 K/min berotze-abiadurarekin igotzen da T_i tenperatura maximo baterarte. Ziklo bakoitzetik bestera, tenperatura maximoaren balioa 50 K-etan igo da, 473 K-tik hasita 873 K-etaraino. Behin tenperatura maximora iritsita, lagina hasierako tenperaturara hozten da berriro 10 K/min-ko hozte-abiadurarekin.

Suberaketa-isokrono ziklo bakoitzaren ostean, PALS neurketak giro-tenperaturaren burutu dira. Horretarako, 250 ps-ko bereizmena duen PALS espektrometro bat erabili da. Espektrometroa, bi H1949-50 Hamamatsu hodi fotobiderkatzailez osatuta dago, eta hodi hauen hasieran Saint Gobain-eko BC-442 plastiko izarnitzaileak jartzen dira. Positroi iturri bezala, $^{20}μCi$ -ko $^{22}NaCl$ iturri bat erabili da. Iturria 7.5 $μm$ lodi den Kapton xafla mehe batez ingurututa dago, eta hau, laginaren bi zati berdinen artean jartzen da (Sandwich erako konfigurazioa). Neuritutako espektruen estatistika 3×10^6 kontu baino handiagokoa izan da eta espektruak POSITRONFIT kodearekin doitu dira.

3.2. Positroi-Bizidenboren Kalkulu Teorikoak

Positroi-deuseztapen bizidenboren kalkuluei dagokionez, λ deuseztapen-ratioa (τ bizidenboraren alderantzizko dena) $n_+(\mathbf{r})$ positroi dentsitatearen eta $n_-(\mathbf{r})$ dentsitate elektronikoaren gainazarmenaren bidez kalkulatzen da

$$\lambda = \tau^{-1} = \pi c r_o^2 \int n_+(\mathbf{r}) n_-(\mathbf{r}) \gamma(\mathbf{r}) d\mathbf{r} \quad (1)$$

non c argiak hutsean duen abiadura den, r_o elektroiaren erradio klasikoa den eta $\gamma(\mathbf{r})$, e^+ -aren presentziak eragiten duen dentsitate elektronikoaren hazkundera modelizatzen duen hobekuntza-faktorea den. Solido perfektu zein akatsdunetan kalkulaturiko positroi-bizidenborak Gainazarmen Atomikoaren Metodoaren bidez kalkulatu dira (AT-SUP). Metodo honek, metal eta erdieroaleetan neurtutako datu esperimentalak ondo aurreatsen ditu (Robles *et al.*, 2007). Simulatutako kristalaren $n_-(\mathbf{r})$ dentsitate elektronikoak eta kristalaren $V_c(\mathbf{r})$ potentzialak, $\mathbf{R}_i$ po-sizioetan kokatutako atomo bakoitzaren banakako $n_{-}^{at}(|\mathbf{r} - \mathbf{R}_i|)$ kargak eta $V^{at}(|\mathbf{r} - \mathbf{R}_i|)$ potentzialak gehitzen eraikitzen dira. Positroiak somatzen duen $V_+(\mathbf{r})$ potentziala, $V_{korrr}[n_-(\mathbf{r})]$ positroi-elektroi korrelazio-potentziala eta potentzial Coulombiarra gehitzen eraikitzen da.

1 Ekuazioko hobekuntza-faktorea eta $V_{korrr}[n_-(\mathbf{r})]$ korrelazio-potentziala bi hurbilketen baitan modelizatu dira; (i) Tokiko Dentsitatearen Hurbilkearen baitan (LDA), eta (ii) Gradiente Orokortuaren Hurbilketaren baitan (GGA). LDA hurbilketan, $V_{korrr}[n_-(\mathbf{r})]$ potentziala Boronski eta Nieminen-ek proposatutako interpolazio formulatan modelizatu da (Boroński eta Nieminen, 1986). $\gamma(\mathbf{r})$ hobekuntza-faktoreari dagokionez, hiru parametrizazio ezberdin erabili dira. Alde batetik, Boronski eta Nieminenek (Boroński eta Nieminen, 1986) proposatutakoa (LDA-BN izenez deitua)

$$\gamma(\mathbf{r})_{LDA}^{BN} = 1 + 1.23r_s + 0.8295r_s^{3/2} - 1.26r_s^2 + 0.3286r_s^{5/2} + \frac{1}{6}r_s^3 \quad (2)$$

non $r_s = (3/4\pi n_-)^{1/3}$ den. $\gamma(\mathbf{r})$ -ren gainontzeko bi adierazpenak, Barbiellini *et al.*-ek (Barbiellini *et al.*, 1995) proposatutakoak dira; LDA-API eta LDA-AP2 deituriko parametrizazioak ondorengoak dira,

$$\gamma(\mathbf{r})_{LDA}^{API} = 1 + 1.23r_s - 0.0742r_s^2 + \frac{1}{6}r_s^3 \quad (3)$$

$$\gamma(\mathbf{r})_{LDA}^{AP2} = 1 + 1.23r_s - 0.91657r_s^{3/2} + 1.0564r_s^2 - 0.3455r_s^{5/2} + \frac{1}{6}r_s^3. \quad (4)$$

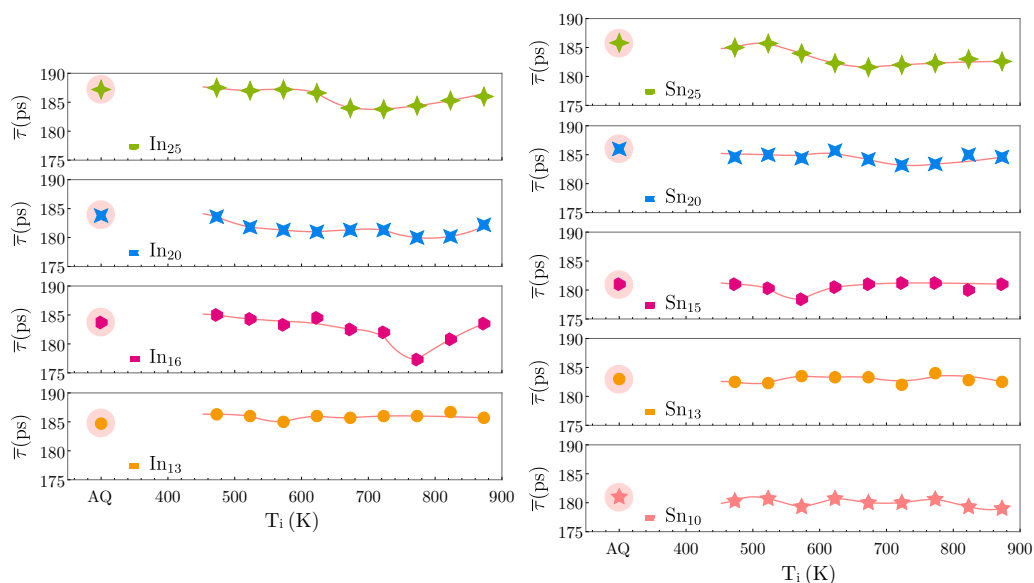
GGA hurbilketaren baitan, bai korrelazio-funtzioa baita hobekuntza-faktorea ere, Arponen eta Pajanne-en lanean (Arponen eta Pajanne, 1979) oinarritutako adierazpenekin modelizatu dira. Garrantzitsua da aipatzea GGA-ren baitan kalkulaturako parametrizazioak LDA-ren baitan kalkulaturakoetatik eratorriak direla. Horrela, GGA hurbilketaren baitan, hobekuntza-faktorearen adierazpena ondokoa da

$$\gamma(\mathbf{r})_{GGA} = 1 + (\gamma(\mathbf{r})_{LDA} - 1) e^{-\alpha\epsilon}, \quad (5)$$

non ϵ dentsitate elektroniko ez-uniformearen eraginak kontutan hartzen dituen parametroa delarik. Erdieroale zein metaletan neurtutako datu esperimentalak hobekien aurreatsen dituen α -ren balioa 0.22 dela frogatu da (Barbiellini *et al.*, 1995). Horrela, 5 Ekuazioko $\gamma(\mathbf{r})_{GGA}$ -parametroa modelizatzeko bi parametrizazio ezberdin erabili dira: (i) 3 Ekuazioko adierazpena ($\gamma(\mathbf{r})_{GGA}^{API}$) eta (ii), 4 Ekuazioko adierazpena ($\gamma(\mathbf{r})_{GGA}^{AP2}$)

3.3. PALS Emaizak Ni-Mn-Z Aleazioetan

1 Irudian, Sn_x eta In_x laginetan neurtutako PALS neurketak erakusten dira, non batazbesteko positroi-bizidenbora ($\bar{\tau}$), T_1 -ren funtzio irudikatzen den. PALS emaitzen lehen puntuak, tenplaketaren ostean neurtutako τ balioak dira

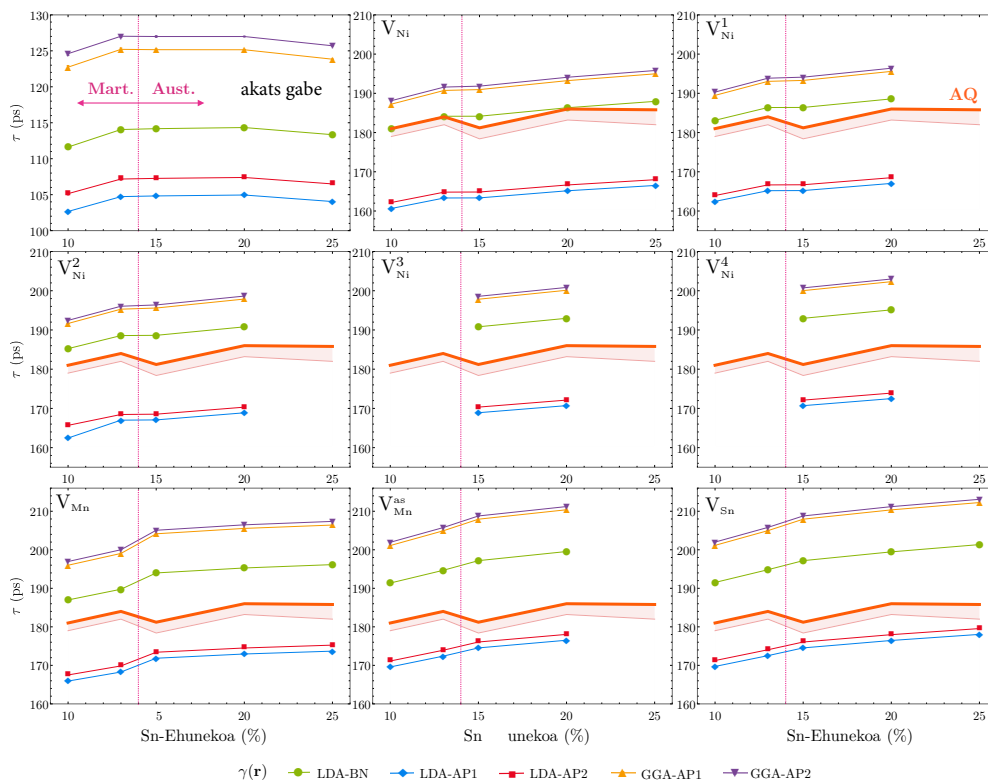


1. irudia. In_x eta Sn_x laginetan neurtutako positroi-bizidenboren batzbesteko τ balioak. Gorriz inguratutako puntuak AQ egoeran neurtutako $\bar{\tau}$ balioak dira. Gainontzeko puntuak T_i -ren funtzioan lortutako $\bar{\tau}$ ren balioak dira. Puntuak lotzen dituzten lerroak gida-lerroak dira eta erroreak marken tamainaren ordenakoak.

(AQ egoera). Bi sistemen kasuan, AQ egoerako $\bar{\tau}$ balioak 181 - 187 ps artean kokatzen dira. Tenplaketa esperimentuak behin eta berriro egin arren, lortutako balioak berdinak izan dira kasu guztietan. Tenplaketan zehar eragindako hutsuneen dinamika aztertu asmoz, suberaketa-isokronoko ziklo ezberdinak egin dira AQ laginetan. Sn_x zein In_x sistemetan, 2 - 3 ps-ko aldaketa txikietatik aparte, $\bar{\tau}$ magnitudeak ez du T_i -rekiko aldaketa nabaririk erakusten. Izatez, In_{16} eta Sn_{15} laginetan soilik ikusi daiteke aldaketa nabaria, non 773 K eta 573 K etara suberatatutako laginen $\bar{\tau}$ balioa 178 ps-ko baliora jaisten den. Hala ere, aldaketa hori azkar berreskuratzen da hurrengo suberaketa-isokronoko zikloetan eta $\bar{\tau}$ hasierako AQ-ko balioetara hurbiltzen da. Aurrerago ikusiko den bezala, espektruak ezin izan dira deskonposatu asetahun-harrapaketaren eskualdean kokatzen direlako, $|\bar{\tau} - \tau_v| < 10$ ps.

1 Ekuazioan ikus daitezkeen bezala, dentsitate elektroniko txikiago batez inguratutako positroiaren kasuan λ txikitu egiten da. Horrela, egoera lokalizatu batetik (positroia akats batean harrapatutik dago) deuseztatzen den positroiaren λ_v deuseztapen-ratioa, egoera deslokalizatutik (positroia ez dago akats batean harrapatutik) deuseztatzen den positroiaren λ_b deuseztapen-ratioa baino txikiagoa da. Ondorioz, hutsune erako akatsetan lokalizatutako positroi-bizidenboraren balioa, egoera deslokalizatutik deuseztatzen denarena baino handiagoa da, eta $\tau_v > \tau_b$ betetzen da. Horrela, 1 Irudian ikus daitezkeen $\bar{\tau}$ -aren balio ia konstanteak azaltzeko, bi agertoki ezberdinekin planteatu daitezke. Alde batetik, demagun laginean bolumen irekiko akatsik ez dagoela (hutsunerik ez). Egoera horretan positroi guztiak egoera deslokalizatu batetik deuseztatuko lirateke, eta esperimentalki neurtutako balioa τ_b -ren oso hurbilekoa izango litzateke. Bestalde, hutsuneen kontzentrazio oso handi baten ondorioz posible da neurtutako $\bar{\tau}$ magnitudearen ekarpenik nagusia hutsuneetan deuseztatzen diren positroiaren izatea. Hutsune-kontzentrazio handi baten ondorioz, positroi denak hutsuneetan harrapatuta gera litezke, eta egoera deslokalizatutik deuseztatzen diren positroiaren ekarpena nulua izango litzateke. Azken egoera honetan, neurtutako $\bar{\tau}$ balioa, hutsuneekin erlazionatutako τ_v balioaren oso berdintsua izango litzateke. Horrela, neurtutako $\bar{\tau}$ balioak hutsuneetan deuseztatutako positroiekin erlazionatuta dauden ala ez ikusteko, elektro-positroi kalkulu teorikoak burutu dira.

Sn_{25} eta In_{25} lagin estekiometrikotan hiru hutsune ezberdin kontsideratu dira kalkuluak egiterako orduan: V_{Ni} , V_{Mn} eta V_Z . Lagin ez estekiometrikoen kasuan, aurrekoetaz aparte, $V_{\text{Mn}}^{\text{as}}$, V_{Ni}^1 , V_{Ni}^2 , V_{Ni}^3 eta V_{Ni}^4 hutsuneak ere kontsideratu dira. 4 Mn atomo eta 4 Z atomo inguratutako Ni atomoari dagokion hutsunea V_{Ni} bezala izendatu da. V_{Ni}^1 hutsunea aldiz, 5 Mn atomo eta 3 Z atomo inguratutako Ni atomoari dagokion hutsuneari deritzo. Ni atomoaren hutsune ezberdin posibleak, arrazoiketa berdina jarraituz adierazi dira, non V_{Ni}^4 -k, 8 Mn atomo inguratutako Ni atomoaren hutsuneari egiten dion erreferentzia. Martensita fasearen kasurako aldiz, 3 eta 4 Mn atomo inguratutako Ni atomoaren hutsuneak V_{Ni}^1 eta V_{Ni}^2 bezala izendatu dira, hurrenez hurren. Azkenik, $V_{\text{Mn}}^{\text{as}}$ hutsunea, Z posizioetan kokatzen den Mn atomo soberakinari dagokion hutsunea da.



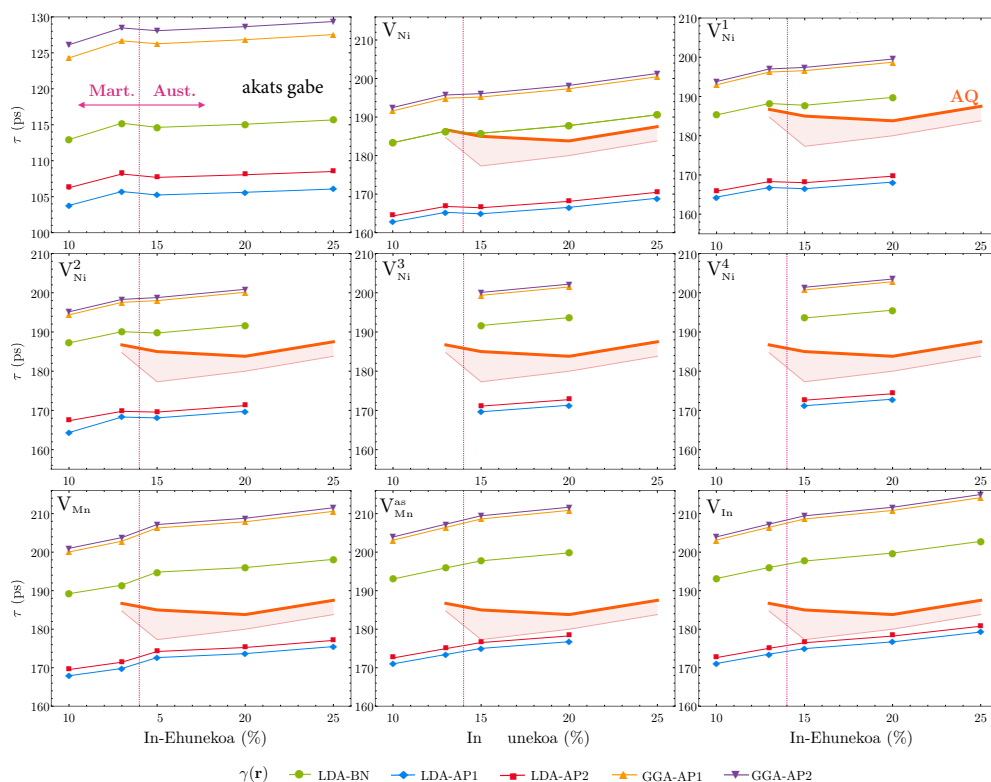
2. irudia. Positroi-bizidenbora teorikoen balioak $\text{Ni}_{50}\text{Mn}_{50-x}\text{Sn}_x$ ($x = 25, 20, 15, 13, 10$) laginetan. Kalkuluak sare perfektuan zein hutsune ezberdinak kontsideratuz egin dira. Gorri irudikatutako eremuak, suberaketa-isokronoko ziklo bakoitzaren ostean neurturiko $\bar{\tau}$ ren balio experimental maximo eta minimoak adierazten ditu. Eskualde honetako lerro lodiak, AQ egoeran neurtutako balioak adierazten ditu.

2 eta 3 irudietan, Sn_x eta In_x sistemetan teorikoki kalkulaturako balioak azaltzen dira. Badirudi GGA bidez kalkulaturako balioak altuagoak direla esperimentera neurtutako balioekin alderatuz. Izan ere, V_{In} eta V_{Sn} hutsuneen kasuetan, auresandako balioak 210 ps-tik gorakoak dira eta esperimentera neurtutako $\bar{\tau}$ balioena (178 - 190 ps) baino 20 ps handiagoak. Hala ere esan beharra dago honek ez duela zuzenean frogatzen $\gamma(\mathbf{r})_{\text{GGA}}$ -ak auresandako balioak gaizki daudetik. Printzipioz, asetahun-harrapaketa eskualdetik kanpo posible da $\tau_v > \bar{\tau} > \tau_b$ izatea. Baina $\gamma(\mathbf{r})_{\text{GGA}}$ -ren bidez auresandako balioak ongi baleude, orduan $\bar{\tau}$ ez litzateke asetahun-harrapaketa eskualdean egongo, eta ondorioz, espektruen deskonposizioa posible izango litzateke. Deskonposizioa egitea ezinezkoa denez, $\gamma(\mathbf{r})_{\text{GGA}}$ -ren bidez kalkulatu diren balioak egokiak ez direla ondoriozta daiteke.

Beste alde batetik, LDA hurbilketa baino, bai $\gamma(\mathbf{r})_{\text{LDA}}^{\text{AP1}}$ baita $\gamma(\mathbf{r})_{\text{LDA}}^{\text{AP2}}$ parametrizazioekin eginiko kalkuluek $\bar{\tau}$ -ren balioa gutxiesten dutela esan daiteke. Zentzu honetan, $\bar{\tau} \leq \tau_v$ ($\lim_{\kappa_v \rightarrow \infty} \bar{\tau} = \tau_v$) baldintza beti behar denez, $\gamma(\mathbf{r})_{\text{LDA}}^{\text{AP1}}$ eta $\gamma(\mathbf{r})_{\text{LDA}}^{\text{AP2}}$ -kin kalkulaturako balioek ezin dezakete esperimentera neurtutako $\bar{\tau}$ balioak azaldu. 3 irudian ikus daitekeen bezala, In_{15} laginaren kasurako bakarrik hurbiltzen diren esperimentera neurtutako balioak, zehazki $V_{\text{Mn}}^{\text{as}}$ eta V_{In} hutsuneen kasurako auresaten diren bizidenboren balioetara. Baina kalkulaturako balio hauek oraindik ere AQ egoeran neurtutako balioetatik urruti daude. $\bar{\tau}$ balioen azpiko mugak ez du hutsunearekin erlaziozaturako bizidenboren balioa islatzen. Suberaketa-prozesuaren ostean posible da hutsuneen kontzentrazioa aldatzea eta $\bar{\tau}$, τ_v -ren balioetik aldentzea. Horrela, kasu honetan ere ondoriozta daiteke $\gamma(\mathbf{r})_{\text{LDA}}^{\text{AP1}}$ eta $\gamma(\mathbf{r})_{\text{LDA}}^{\text{AP2}}$ parametrizazioekin kalkulaturako balioak ez direla egokiak.

Bukatzeko, eta $\gamma(\mathbf{r})_{\text{LDA}}^{\text{BN}}$ -en bidez kalkulaturako positroi-bizidenboren balioak, GGA eta $\gamma(\mathbf{r})_{\text{LDA}}^{\text{AP1}}$ eta $\gamma(\mathbf{r})_{\text{LDA}}^{\text{AP2}}$ parametrizazioek auresandakoen tartean kokatzen dira. 2 eta 3 irudietan ikusi daitekeen bezala, badirudi parametrizazio honek auresandako balioak direla esperimentera neurtutako $\bar{\tau}$ balioetara hobekien hurbiltzen direnak.

$\gamma(\mathbf{r})_{\text{LDA}}^{\text{BN}}$ parametrizazioaren bidez kalkulaturako positroi-bizidenboren balioak 1 taulan ageri dira. Alde batetik, $V_{\text{Mn}}^{\text{as}}$ eta V_{Z} hutsuneekin erlaziozaturako balioak berdinak direla ikusi daitezke. Mn atomo soberakinak Z atomei dagozkien posizioak betetzeko joera dute. Horrela, Z atomoen eta antikokapen erako Mn atomoen ingurune hurbila



3. irudia. Positroi-bizidenbora teorikoen balioak $\text{Ni}_{50}\text{Mn}_{50-x}\text{In}_x$ ($x = 25, 20, 16, 13, 10$) laginetan. Kalkuluak sare perfektuan zein hutsune ezberdinak kontsideratuz egin dira. Gorritz irudikatutako eremuak, suberaketa-isokronoko ziklo bakoitzaren ostean neurturiko $\bar{\tau}$ ren balio esperimental maximo eta minimoak adierazten ditu. Eskualde honetako lerro lodiak, AQ egoeran neurtutako balioak adierazten ditu.

berdina da (8 Ni atomo). Horren ondorioz, bi akats hauekin erlazionatutako bizidenboren balioak berdinak dira. Bestalde, V_{Sn} eta V_{In} hutsuneen bizidenborak dira balio handienak erakusten dituztenak, In_x lagin batzuen kasuan 200 ps-tik gorakoak direlarik. V_{Mn} eta $V_{\text{Mn}}^{\text{as}}$ atomoen hutsuneekin erlazionatutako balioak dira jarraian handienak direnak, esperimentalki neurtutako $\bar{\tau}$ balioetatik nahiko urruti daudenak, alegia.

Sn_x eta In_x laginetako konposizio guztien kasuan, V_{Ni} da positroi-bizidenbora txikiena erakusten duena. Balio hau gainera, estekiometrietatik haratagoko konposizioetan txikiagotu egiten da, 190 ps-tik hasi eta 181 ps-raino. Bestalde V_{Ni}^i -ekin erlazionatutako bizidenboren balioa handitu egiten da Mn atomek Z atomoen posizioak ordezkatu ahala. Izatez, Ni atomoaren inguruan Mn atomo bat gehiago kokatuta, positroi-bizidenboren balioak batazbestean ≈ 2 ps handitzen dira, ikus 1 taula. Sn eta In atomoek elektroi gehiago dituzte Mn atomoak baino. Horrela, Mn atomoak Z atomoen posizioak betetzen dituztenean Ni atomoaren inguruko dentsitate elektronikoa txikiagotu egiten da. 1 Ekuazioaren arabera, dentsitate elektronikoa txikiago batek λ_v deuseztapen-ratioa txikiagoa suposatzen du, eta ondorioz, hutsune horrekin erlazionatutako positroi-bizidenbora handitu egiten da.

Akats-motaren zehaztapenarekin jarraituz, 2 eta 3 irudietan ikusi daitekeen bezala, V_{Ni} -ri dagokion bizidenbora da AQ laginen $\bar{\tau}$ balio esperimentalak hobekien aurrezaten dituenak (lerro gorria). Sn_x sisteman, Sn_{25} , Sn_{20} , Sn_{13} eta Sn_{10} laginen kasurako, $\bar{\tau}$ balioak eta V_{Ni} -ren balioak guztiz bat datoz. Sn_{15} -aren kasurako aldiz, desbiderapena 1 ps-koa da. Gainontzeko akatsekin erlazionatutako balio teorikoen eta esperimentalen arteko desadostasuna 4 ps ingurukoa da. In_x sistemari dagokionez, balio esperimentalak hobeto aurrezaten dituen hutsune mota V_{Ni} da berriz ere. In_{16} eta In_{13} laginen kasuetan adibidez, balio esperimental eta teorikoak guztiz bat datoz, eta In_{20} eta In_{25} kasuan aldiz, desbiderapena 2 ps ingurukoa da. Horrela, datu esperimental eta teorikoek babestuta, Ni-Mn-Sn eta Ni-Mn-In laginen hutsune-mota V_{Ni} dela baieztatu daiteke.

Sn_x eta In_x laginetan $\gamma(\mathbf{r})_{\text{LDA}}^{\text{BN}}$ parametrizazioarekin lortutako emaitzen zehaztasuna ziurtatze eta baieztatze aldera, eta Ni_2MnGa aleazioetan aurretiaz burutu diren neurketek baliatuz (Merida, 2016), lagin honetan kalkulu teorikoak egin dira datu esperimental hauekin alderatzeko. Testuinguru honetan, Merida *et al.*-ek tenplatutako (AQ

1. taula. Sn_x eta In_x laginetan, hainbat hutsuneentzako eta sare perfekturako $\gamma(\mathbf{r})^{\text{BN}}_{\text{LDA}}$ parametrizazioaren bidez kalkulaturiko positroi-bizidengaren balioak (ps-tan).

Z_x	τ_b	V_{Ni}					V_{Mn}		V_z
		V_{Ni}	V_{Ni}^1	V_{Ni}^2	V_{Ni}^3	V_{Ni}^4	V_{Mn}	$V_{\text{Mn}}^{\text{as}}$	
Sn_{25}	113	187	(-)	(-)	(-)	(-)	196	(-)	201
Sn_{20}	114	186	189	191	193	195	195	200	200
Sn_{15}	114	184	186	189	191	193	194	197	197
Sn_{13}	114	184	186	189	(-)	(-)	190	195	195
Sn_{10}	111	181	183	185	(-)	(-)	187	191	191
In_{25}	116	191	(-)	(-)	(-)	(-)	198	(-)	203
In_{20}	115	188	190	192	194	196	196	200	200
In_{16}	114	186	188	190	192	194	195	198	198
In_{13}	115	186	188	190	(-)	(-)	191	196	196
In_{10}	113	183	185	187	(-)	(-)	189	193	193
Ni_2MnGa	116	182	(-)	(-)	(-)	(-)	185	(-)	185

egoera) Ni_2MnGa laginetan neurtutako positroi bizidengaren balioa 182 ps-koa da (Merida, 2016). Balio hau bat dator 1 Taulako V_{Ni} -ren balioarekin. Aipatzekoa da Merida *et al.*-ek neurtutako $\bar{\tau}$ balioa austenita fasean neurtu dela, lagin estekiometrikon $T_{\text{TM}} \approx 200$ K delako. Tenplatutako Ni_2MnGa laginetan neurtutako $\bar{\tau}$ balioak hutsuneekin erlazionatu dira lan hauetan, eta zenbatetsitako C_v -a 1000 - 2000 ppm ingurukoa izan da. Horrela, Ni_2MnGa laginean burututako positroi-deuseztapen erdibizitza-denboren kalkulu teorikoak bat datoz Merida *et al.*-ek lagin hauetan lortutako hutsuneekin erlazionatutako $\bar{\tau}$ balio esperimentalekin. Beraz, Ni_2MnGa sistemetan hutsune-mota probableena V_{Ni} dela esan daiteke.

Esperimentalki frogatutako ondorio hauek bat datoz aurretiaz eginiko beste ikerketa teoriko batzuen emaitzeekin. Wang *et al.*-ek 2018 eginiko ikerketa teorikoan Ni-Mn-Ga laginetako hutsune motarik probableena V_{Ni} dela frogatu dute. Ni-Mn-Sn eta Ni-Mn-In aleazioei dagokienez, zenbait ikerketa teorikok aurreratu dute V_{Ni} dela hutsune motarik probableena. Kulkova *et al.*-ek frogatu bezala (Kulkova *et al.*, 2008), Ni_2MnSn eta Ni_2MnIn laginetan, V_{Ni} hutsunea da E_f hutsuneen formazio-energia baxuena duen hutsune erako akatsa ($E_f = 0.4$ eV eta $E_f = 0.7$ eV formazio-energiekin, hurrenez hurren). Bestalde, V_{Mn} eta V_z hutsune-moten formazio-energien balioak askoz ere altuagoak direla ere aurreratu dute; Ni_2MnSn laginetan akats hauen formazio-energiak 1.04 eV eta 2.59 eV dira hurrenez hurren, eta Ni_2MnIn kasuan 1.58 eV eta 2.29 eV. Bai *et al.*-ek (Bai *et al.*, 2010) eginiko ikerketetan ere ondorio bera plazaratzen da, non V_{Ni} hutsuneen formazio-energiaren balioa $E_f = 0.59$ eV den Ni_2MnIn kasurako (txikiena gainontzeko hutsune-moten artean). Horrela, lan honetako emaitza teoriko eta esperimentalak eta literaturan aurki daitezkeen lanak kontutan hartuz, Ni-Mn-Ga, Ni-Mn-Sn eta Ni-Mn-In sistemetan agertzen diren hutsuneak V_{Ni} direla ondorioztatzen da.

4. Ondorioak

PALS emaitza esperimentalak elektro-positroi kalkulu teorikoekin konbinatuz, $\text{Ni}_{50}\text{Mn}_{50-x}\text{Sn}_x$ ($x = 25, 20, 15, 13, 10$), $\text{Ni}_{50}\text{Mn}_{50-x}\text{In}_x$ ($x = 25, 20, 16, 13, 10$) eta Ni_2MnGa laginen hutsune erako akatsak aztertzen dira. Alde batetik, aleazio hauen hutsune mota esperimentalki V_{Ni} dela frogatzen da. Horretarako positroiaren presentziak eragiten duen dentsitate elektronikoaren hazkundera modelizatzen duen hobekuntza-faktorearen bost parametrizazio ezberdin aztertu dira: Guzti hauek $\gamma(\mathbf{r})^{\text{BN}}_{\text{LDA}}$ parametrizazioak aurreratu ditu hobekien PALS neurketa esperimentalak. Lan honen emaitzek, hutsune mota zehaztetik haratago, alezio hauetan kalkulu teorikoak burutu ahal izateko oinarriak ezartzen dituzte.

5. Erreferentziak

Arponen, J, eta E Pajanne. 1979. Electron liquid in collective description. iii. positron annihilation. *Annals of Physics* 121.343 – 389.

- Bai, J., J. M. Raulot, Y. D. Zhang, C. Esling, X. Zhao, eta L. Zuo. 2010. Defect formation energy and magnetic structure of shape memory alloys ni- x -ga ($x = \text{mn, fe, co}$) by first principle calculation. *Journal of Applied Physics* 108.064904.
- Barbiellini, B., M. J. Puska, T. Torsti, eta R. M. Nieminen. 1995. Gradient correction for positron states in solids. *Physical Review B* 51.7341–7344.
- Boroński, E., eta R. M. Nieminen. 1986. Electron-positron density-functional theory. *Physical Review B* 34.3820–3831.
- Krenke, Thorsten, Eyup Duman, Mehmet Acet, Eberhard F. Wassermann, Xavier Moya, Lluís Manosa, eta Antoni Planes. 2005. Inverse magnetocaloric effect in ferromagnetic ni-mn-sn alloys. *Nature Materials* 4.450–454.
- Kulkova, S.E., S.V. Eremeev, S.S. Kulkov, eta V.A. Skripnyak. 2008. Ab initio investigations of magnetic properties of thin film heusler alloys. *Materials Science and Engineering: A* 481-482.209 – 213. Proceedings of the 7th European Symposium on Martensitic Transformations, ESOMAT 2006.
- Kumar, S. Vinodh, R.K. Singh, M. Manivel Raja, A. Kumar, S. Bysakh, eta M. Mahendran. 2016. Microstructure and nanomechanical properties of mn-rich ni-mn-ga thin films. *Intermetallics* 71.57 – 64.
- Kustov, S., J. Pons, E. Cesari, eta J. Van Humbeeck. 2004. Pinning-induced stabilization of martensite: Part i. stabilization due to static pinning of interfaces. *Acta Materialia* 52.3075 – 3081.
- Liu, Jian, Tino Gottschall, Konstantin P. Skokov, James D. Moore, eta Oliver Gutfleisch. 2012. Giant magnetocaloric effect driven by structural transitions. *Nature Materials* 11.620–626.
- Llamazares, J. L. Sánchez, H. Flores-Zú niga, D. Ríos-Jara, C. F. Sánchez-Valdes, T. García-Fernández, C. A. Ross, eta C. García. 2013. Structural and magnetic characterization of the intermartensitic phase transition in ni-mn-sn heusler alloy ribbons. *Journal of Applied Physics* 113.17A948.
- Merida, D., 2016. *Caracterización de la Dinámica de Vacantes en Aleaciones Ferromagnéticas con Memoria de Forma del Sistema NiMnGa*. The address of the publisher: University of the Basque Country tesia. An optional note.
- Peruman, K. Vallal, S. Vinodh Kumar, K. Pushpanathan, eta M. Mahendran. 2011. Structural and martensitic transformation of bulk, disordered and nanocrystalline ni₂mnga alloys. *Functional Materials Letter* 04.415–418.
- Robles, J. M. Campillo, E. Ogando, eta F. Plazaola. 2007. Positron lifetime calculation for the elements of the periodic table. *Journal of Physics: Condensed Matter* 19.176222.
- Sánchez-Alarcos, V., V. Recarte, J.I. Pérez-Landazábal, eta G.J. Cuello. 2007. Correlation between atomic order and the characteristics of the structural and magnetic transformations in ni-mn-ga shape memory alloys. *Acta Materialia* 55.3883 – 3889.
- Santamarta, R., E. Cesari, J. Font, J. Muntasell, J. Pons, eta J. Dutkiewicz. 2006. Effect of atomic order on the martensitic transformation of ni-fe-ga alloys. *Scripta Materialia* 54.1985 – 1989.
- Sutou, Y., Y. Imano, N. Koeda, T. Omori, R. Kainuma, K. Ishida, eta K. Oikawa. 2004. Magnetic and martensitic transformations of ni-mn- x ($x=\text{in,sn,sb}$) ferromagnetic shape memory alloys. *Applied Physics Letters* 85.4358–4360.
- Wang, Yuhao, Daniel Salas, Bharat Medasani, Peter Entel, Ibrahim Karaman, Raymundo Arróyave, eta Thien C. Duong. 2018. First-principles characterization of equilibrium vacancy concentration in metamagnetic shape memory alloys: An example of ni₂mnga. *Physica Status Solidi (B)* 255.1700523.
- Zhang, Yu, Linlin Zhang, Qiang Zheng, Xinqi Zheng, Ming Li, Juan Du, eta Aru Yan. 2015. Enhanced magnetic refrigeration properties in mn-rich ni-mn-sn ribbons by optimal annealing. *Scientific Reports* 5.11010 EP –.

6. Eskerrak eta Oharrak

Ikerketa hau Eusko Jaurlaritzaren IT-1005-16 eta IT-756-13 proiektuekin finantzatu da, baita Eusko Jaurlaritzaren doktoratu-aurreko PRE-2014-201 bekarekin ere. Egilleek Espainako Ekonomia eta Lehiakortasun Ministerioaren (MINECO) MAT2015-65165-C2-R (MINECO/FEDER) laguntza eskertzen dute.

Tentsio altuko katodoak geruza meheko litio-ioi baterietarako

Madinabeitia, Iñaki^{1,2}; Rikarte, Jokin¹; Baraldi, Giorgio¹; Etxebarria, Ane¹;
Garcia, Alberto²; Fernandez, Francisco² eta Muñoz, Miguel Ángel¹

¹CIC Energigune, Arabako Teknologi Parkea

²TECNALIA, Gipuzkoako Zientzia eta Teknologia Parkea
imadinabeitia@cicenergigune.com

Laburpena

Tentsio altuko litio-ioi baterietan erabiltzen diren materialen artean $\text{LiNi}_{0.5}\text{Mn}_{1.5}\text{O}_4$ -aren (LNMO) espinela fasea da etorkizun handienetakoa duena. Ikerketa lan honetan, LNMO geruza mehea altzairu herdoilgaitz substratuen gainean ezarri da AC ihintadura-katodiko bitartez. Ondoren, tratamendu termikoa aplikatu zaie lorturiko laginen kristalizazioan tenperaturak izan dezakeen eragina aztertzeke asmotan. Azkenik, karga/deskarga test galbanostikoa erabili da beraien ezaugarri elektrokimikoak ezagutzeko eta, bide batez, merkatuan aurki daitezkeen elektrodoarekin konparatu da.

Hitz gakoak: Litio-ioi bateria, $\text{LiNi}_{0.5}\text{Mn}_{1.5}\text{O}_4$, Geruza mehea, Ihintadura-katodikoa, Altzairu herdoilgaitza

Abstract

The spinel phase of $\text{LiNi}_{0.5}\text{Mn}_{1.5}\text{O}_4$ (LNMO) is considered one of the most promising material for high-voltage lithium-ion batteries. In this work, the LNMO thin films were deposited by AC magnetron sputtering on Stainless steel substrates. The cathodes were post-annealed to study the impact of the temperature on its crystallization. Finally, the electrochemical properties were investigated with galvanostatic charge/discharge test, and were compared with a commercial LNMO electrode.

Keywords: Lithium ion battery, $\text{LiNi}_{0.5}\text{Mn}_{1.5}\text{O}_4$, Thin film, Sputtering, Stainless steel

1. Sarrera eta uneko egoera

1991.urtean ezagutzera eman zenetik etengabe doa gorantz litio-ioi baterien eskaera. Gaur egun, bateria horiek hainbat gailu elektronikoren energia iturri moduan erabiltzen dira; horien artean, mugikorak, ordenagailu eramangarriak edota ibilgailu elektrikoak aurkitu ditzakegu (Armand *et al.*, 2008). Teknologia hobetuz doan heinean, energia kontsumoa ere gorantz doa. Premia honi aurre egiteko, merkatuan aurkitu daitezkeenak baino energia dentsitate handiagoa duten baterien garapena beharrezkoa da. Hori dela eta, bateriaren osagai desberdinen (elektrodo eta elektrolitoa) ezaugarri elektrokimikoak hobetu ditzaketen material berriak identifikatu eta ikertu behar dira.

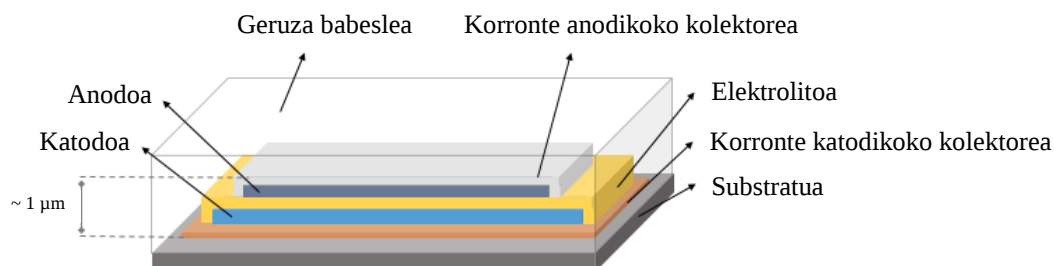
Elektrodo positiboari dagokionez, LiCoO_2 moduko oxido laminarrak, $\text{Li}_x\text{Mn}_2\text{O}_4$ espinelak, LiMPO_4 (M = Fe, Mn edo Co) erako fosfatoak eta banadio oxidoak dira gehien ikertzen diren materialak (Oudenhoven *et al.*, 2011). Horien artean, $\text{LiNi}_{0.5}\text{Mn}_{1.5}\text{O}_4$ (LNMO) tentsio altuko espinela da erakargarriena; merkea, ez toxikoa eta energia dentsitate altua daukalako (Santhanam *et al.*, 2010 eta Manthiram *et al.*, 2014). Bere ezaugarrien artean 4.75 V vs. Li/Li^+ -eko lan tentsioa eta 147 mAh/g-ko biltegitratze ahalmena aurkitu ditzakegu (Li *et al.*, 2013).

Hala ere, likido egoerako elektrolitoek tentsio altuan (4-5 V vs. Li/Li^+) duten egonkortasun urriak mugatzen du litio-ioi baterien teknologia konbentzionala (Aurbach, 2000). Horrez gain, erabiltzen diren disolbatzaileak oso sukoiak dira (*thermal runaway* mekanismoa); zirkuitulabur, gaitzera edo berotze kasuetan segurtasuna murriztuz (Wang *et al.*, 2012).

Beraz, tentsio altuko katodoen merkaturatze eta eskala handiko produkzioarako konponbide interesgarria egoera solidoko bateriak dira. Ohiko litio-ioi bateriek ez bezala, aipaturiko bateria horietan elektrolito likidoa egoera solidoko elektrolito batengatik ordezkatzeko da. Horrela, segurtasun eta egonkortasun hobea bermatzen da; era berean, ahalmena biderkatu, karga denbora murriztu eta balio-bizitza luzatzen delarik.

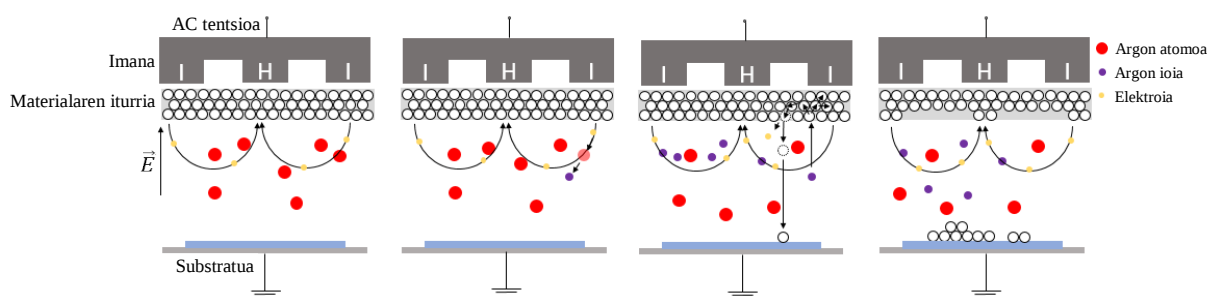
Egoera solidoko baterien barruan geruza meheko bateriak aurkitu ditzakegu (mikrobateria moduan ezagunak), 1. irudia, mikrometro azpiko lodiera duten elektrodo eta elektrolitoengatik bereiziak.

1. irudia. Geruzaz geruza substratu baten gainean fabrikatu den geruza meheko bateriaren eskema



Gaur egun, geruza meheak egiteko gehien erabiltzen diren teknikak hutsune ganberan oinarritzen dira. Horien artean, laser-ablazioa (PLD, *pulsed laser deposition*), lurrinketa termikoa eta ihintadura-katodikoa (*magnetron sputtering*) dira entzunenak. Ikerketa honetan azken teknika hori erabiliko da, lorturiko estaldurak akats gutxikoak, konposizio egokidunak eta uniformeak direlako (Baggetto *et al.*, 2012). Ihintadura katodikoaren prozesua 2. irudian ikusi daiteke, bertan elektrodi kolisio bitartez sorturiko argon ioiak lortu nahi den geruzaren material iturria kolpatzen dute, talkaren ondorioz bertatik partikulak ateraz; horiek ganbera guztia zeharkatu eta substratuan ezartzen direlarik.

2. irudia. Ihintadura-katodikoaren prozesuaren ilustrazioa



Mikrobaterietan teknika honen erabilerak baterien diseinu eta arkitektura berriei atea ireki die, bateria flexible eta tamaina txikikoak lortzea ahalbidetuz (Qian *et al.*, 2019). Gaur egun txartel inteligentetan, irati-maiztasun identifikazio etiketetan, gailu elektroniko txikietan eta gauzen Interneta delakoaren kontzeptuan (IOT, *Internet Of Things*) aurkitu ditzakegu.

2. Ikerketaren helburuak

Lan honetan, tentsio altuko katodoa fabrikatu eta bere ezaugarri fisiko-kimiko, morfologiko eta elektrokimikoak ikertu dira. Horrela, ondorengo helburu zientifikoak lortzea nahi da:

- Geruza kristalizatzeko beharreko post-tratamendu termikoa optimizatzea.
- Zenbait korrante intentsitate balioen aurrean katodoaren portaera elektrokimikoa aztertzea.
- Gaur egun merkatuan aurki daitezkeen elektrodoekin konparatzea.

3. Ikerketaren muina

3.1. Materialaren prestaketa eta ikerketa teknikak

Korronte alternoko (AC) Cemecon 800 CC ihinzadura-katodiko bitartez egin da LNMO estaldura. Geruza mehea 16 mm diametroko 316L altzairu herdoilgaitz diskoen (Honsen Corp.) gainean ezarri da. Substratuak materialaren iturritik 7 cm-tara kokatu dira, 12mm-ko zulodun maskara bat erabiliz. Ganberan 1000 mPa-eko lan presioa ezarri da eta 1.70 W/cm²-ko dentsitate potentziala aplikatu da. Baldintza horiekin, 500 nm/h-ko estaldura abiadura erdietsi da. Prozesuaren denbora 1 µm-ko lodiera eta 0.5 mg-ko pisua lortzeko moldatua izan da.

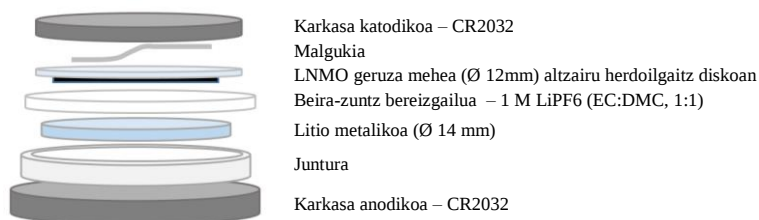
Lorturiko geruza meheak 300°C eta 600°C-ra berotu dira ordubetez airean, 5°C/min berotze maldarekin, ondoren hozten utziz giro-tenperatura arte.

X-izpien difrakzio teknika (XRD, *X-ray powder diffraction*) erabili da laginaren tenperaturaren arabeko kristalizazio egoera aztertzeko. Neurketa 15° eta 55° 2θ tartean burutu da Advanced D8 difraktometroa erabiliz.

Laginen gainazalaren morfologia Fei Quanta-200FEG ekorketa bidezko mikroskopia elektroniko (SEM, *Scanning Electron Microscopy*) bitartez aztertu da.

Katodoen karakterizazio elektrokimikoa botoi-pila (CR2032) bitartez burutu da, 3. Irudia. Bertan 14 mm diametrodun litio metalikoa erabili da anodo bezala eta 1M LiPF₆ EC:DMC (etilen karbonatoan eta dimetil karbonatoan 1:1 nahastea bolumenean) elektrolito moduan.

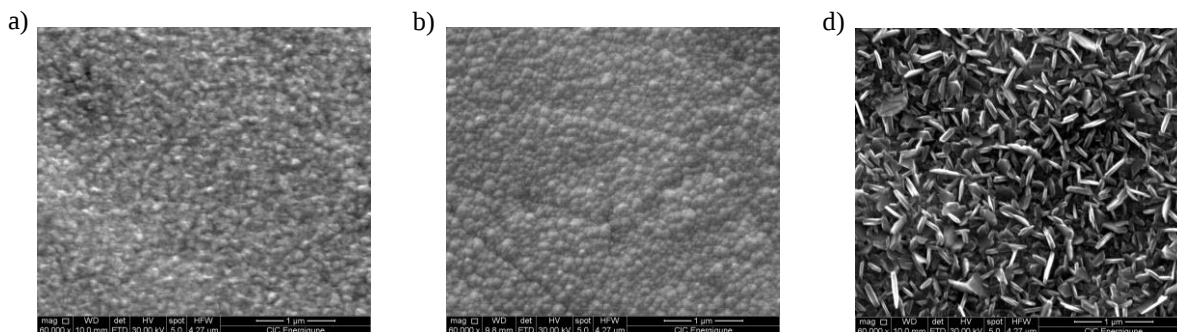
3. irudia. Botoi-pilaren barne egitura (CR2032).



3.2. Karakterizazio estrukturala

4. irudian LNMO geruza mehearen gainazalaren bilakaera ikus daiteke tenperaturarekiko. Tratatu gabeko laginak 100 nm baino txikiagoko ale amorfoz osaturiko zimurtasun gutxiko gainazala erakusten du. 300°C-tara berotu ondoren, aleen tamainen handitze minimo bat antzeman daiteke, baina, ez da inongo kristalizaziorik nabaritzen kasu honetan ere. 600°C-ra beroturiko laginak beste bi kasuen morfologia zeharo desberdina aurkeztzen du; irudian ikus daiteken bezala, 400 nm-ko luzera eta 60 nm-ko zabalera duten kristal luzexkak sortu dira.

4. irudia. Tenperatura desberdinetan trataturiko LNMO laginen gainazalaren SEM irudiak: a) tratatu gabea, b) 300°C eta d) 600°C

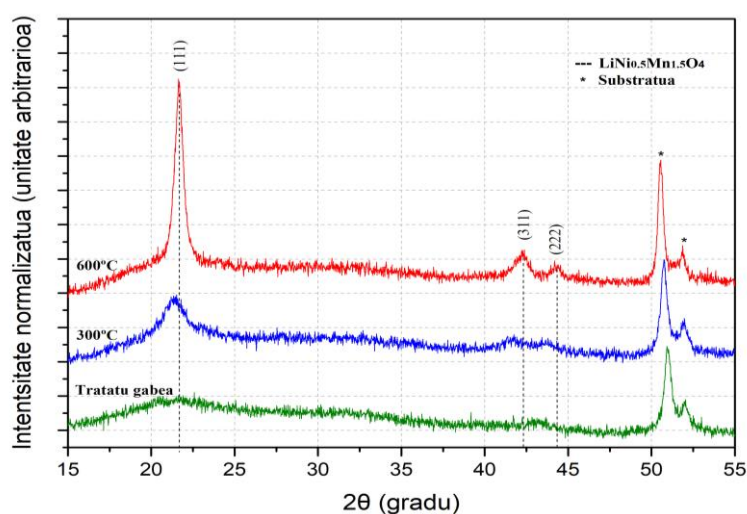


5. irudian tenperatura desberdinetan berotu diren katodoen XRD emaitzak agertzen dira. Difrakzioan LNMO-ari dagokien tontor guztiak Fd-3m talde espazialari dagokion espinela estrukturarekin indexatu dira. Lagin guztietan agertzen diren tontor gehigarriak, altzairu herdoilgaitzari dagokienez bat datoz.

Tratatu gabeko laginaren difraktograman 50.5° eta 52° 2θ posizioetan kokaturiko bi tontor antzematen dira. Horiek, ez dira LNMO-aren kristal estrukturaren parte, aurrez esan bezala, substratuarekin lotu daitezke. Honek, laginaren izaera amorfoa baieztatzen du.

300°C -ko tratamendu termikoaren ostean, altzairu herdoilgaitzaren ekarpenaz gain, 21.5° 2θ inguruan kristalizazioaren hasiera adierazten duen tontor zabal bat ageri da LNMO-aren (111) difrakzioarekin lotuta dagoena. Tenperatura 600°C -ra igo ahala, (111) tontor nagusia estuagoa da, fasearen kristalizazioa handiagoa iradokiz. Gainera, tenperatura honetan, (311) eta (222) faseei dagozkien tontor berriak agertzen dira.

5. irudia. Tenperatura desberdinetan trataturiko LNMO laginen gainazalaren XRD difraktogramak.



3.3. Karakterizazio elektrokimikoa

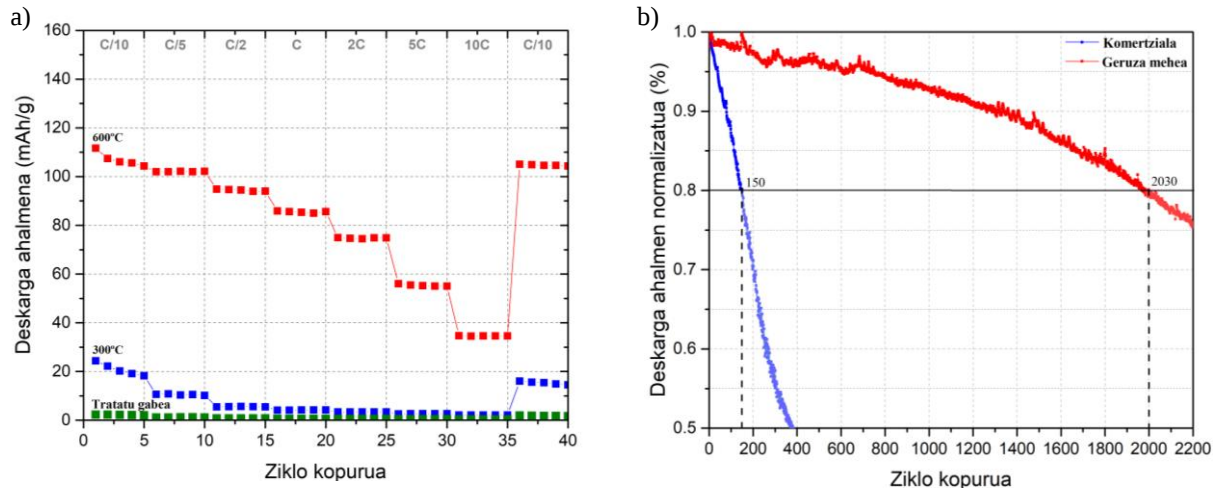
6. irudian tratatu gabeko eta 300°C eta 600°C -ko tratamendu termikoa jasan duten laginen jokaera elektrokimikoa erakusten da. Katodo bakoitzaren biltegitratze ahalmena aztertu da aplikaturiko zenbait korrante intentsitate balio ezberdinen aurrean, balio bakoitzarekin bost karga eta deskarga ziklo egin dira. 6.a. irudian ikus daitekeen bezala, LNMO-aren biltegitratze ahalmena bere kristalizazio mailarekin zuzenki lotuta dago. Emaiza hoberena 600°C -ra berotutako laginak eman du, C/10-eko korrante intentsitate balioarekin (10h karga eta 10h deskarga) batez besteko 107.03 mAh/g lortuz; 300°C -koak eta tratatu gabeak, 20.83 mAh/g eta 2.15 mAh/g emanik hurrenez hurren. kristal-sarean litio-ioien difusio zailtasuna dela eta, intentsitatearen balioa handitu ahala karga biltegitratze ahalmena jaisten doa. Aplikaturiko korrante handienarekin, 10C, kristalizaturiko lagina oraindik 35 mAh/g biltegitratzeko gai da, beste biek ez bezala. Testaren lehen eta azken zikloak intentsitate balio berdinarekin burutu dira, 600°C -aren kasuan hasierako balioaren %95.10-eko gordetze ahalmena lortu da amaieran. Honek esan nahi du testaren zehar elektrodoaren eta elektrolitoaren interfasea egonkor mantendu dela eta ez dagoela bien arteko deskonposaketarik.

Kristalizatzeko beharrezko tenperatura zehaztu eta portaera elektrokimikoa aztertu ondoren, merkatuan aurkitu daitekeen geruza meheko elektrodo batekin (CustomCells) konparatu nahi izan da.

Bi bateriak egitura berarekin muntatu dira, parte esperimentalean deskribatzen den bezala, eta C-ra eginiko (1h karga eta 1h deskarga) bizi-zikloa burutu dute. Hau da, lehen zikloan lortu duten biltegitratze ahamenaren %80-ra iristen direneko ziklo kopurua zenbatu da; baterien

aplikagarritasun ikuspuntutik parametro garrantzitsua izanik. Lorturiko emaitzak 6.b. irudian ageri dira, bertan deskargako biltegitratze ahalmen normalizatua ziklo kopuruaren funtzio irudikatu da. Lan honetan eginiko geruza meheko LNMO-ak ziklabilitate handiagoa duela ondorioztatu da, 2030 ziklo iraun ditu, komertzialak 150 lortu dituen bitartean.

6. irudia. a) Korrante desberdinen testa eta b) bizi-zikloa.



4. Ondorioak

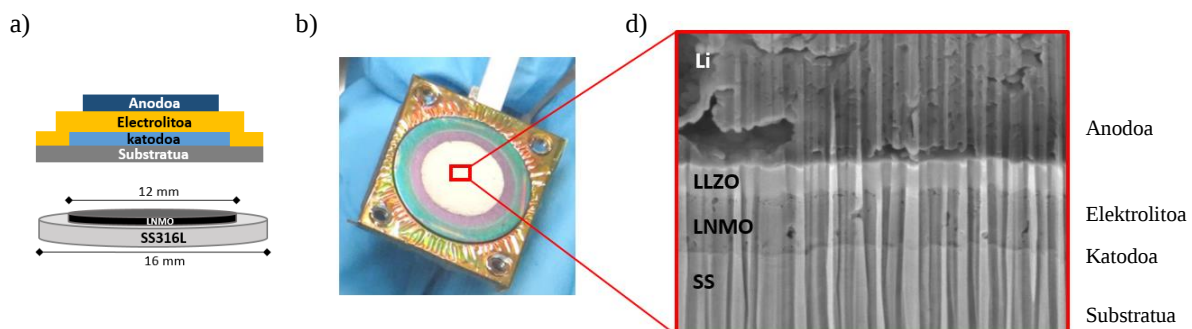
Ikerketa lan honetan, AC ihintadura-katodikoa bitartez LNMO geruza meheak ezarri dira altzairu herdoilgaitzeko substratuetan. Katodo horien morfologia eta kristalizazio maila zuzenki lotuta daude aplikaturiko tratamendu termikoarekin, 600°C izanik espinela fasea lortzeko beharrezko tenperatura. Hori dela eta, azken lagin horrek eman du portaera elektrokimiko hoberena, C/10-era 107.03 mAh/g-ko deskarga biltegitratze ahalmena emanez eta 35 mAh/g lortuz korrante intentsitate balio altuenean. Gainera, emaitza oparoak erdietsi dira elektrodo komertzialarekin alderatutako bizitza zikloan, 2030 ziklo eginik komertzialaren 150-en aurrean.

5. Etorkizunerako planteatzen den norabidea

Une honetan, geruza meheko LNMO katodoa egoera solidoko mikrobaterietan inplementatzen ari gara.

7. irudian bateriaren osagaiak geruzaz geruza ezarri diren lehen proba bat agertzen da. LNMO-aren gainean $\text{Li}_7\text{La}_3\text{Zr}_2\text{O}_{12}$ (LLZO) elektrolitoa jarri da ihintadura-katodikoa bitartez, eta guzti hau, baporizazio termikoz lorturiko litio metalikoz estali da.

7. irudia. Geruzaz geruza fabrikatu den geruza meheko tentsio altuko litio-iei bateria: a) bateriaren eskema, b) bateriaren argazkia eta d) geruzen SEM irudia.



6. Erreferentziak

- Armand, M. et al. (2008): “Building better batteries”, *Nature*, 451, 652-657.
- Oudenhoven J. F. M. et al. (2011): “All-Solid-State Lithium-Ion Microbatteries: A Review of Various Three-Dimensional Concepts”, *Adv. Energy Mater.*, 1, 10-33.
- Santhanam, R. et al. (2010): ” Research progress in high voltage spinel $\text{LiNi}_{0.5}\text{Mn}_{1.5}\text{O}_4$ material”, *J. Power Sources*, 195, 5442-5451.
- Manthiram, A. et al. (2014): “A perspective on the high-voltage $\text{LiMn}_{1.5}\text{Ni}_{0.5}\text{O}_4$ spinel cathode for lithium-ion batteries”, *Energy Environ. Sci.*, 7, 1339–1350.
- Li, J. et al. (2013): “An artificial solid electrolyte interphase enables the use of a $\text{LiMn}_{1.5}\text{Ni}_{0.5}\text{O}_4$ 5V cathode with conventional electrolytes”, *Adv. Energy Mater.*, 3, 1275-1278.
- Aurbach, D. (2000): “Review of selected electrode–solution interactions which determine the performance of Li and Li ion batteries”, *J. Power Sources*, 89, 206–218.
- Wang, Q. et al. (2012):”Thermal runaway caused fire and explosion of lithium ion battery”, *J. Power Sources*, 2018, 210-224.
- Baggetto, L. et al. (2012): “Fabrication and characterization of $\text{LiMn}_{1.5}\text{Ni}_{0.5}\text{O}_4$ sputtered thin film high voltage cathodes for Li-ion batteries”, *J. Power Sources*, 211, 108-118.
- Qian, G. et al. (2019): “Designing Flexible Lithium-Ion Batteries by Structural Engineering”, *ACS Energy Lett.*, 4, 690–701.

7. Eskerrak eta oharrak

Lan honetako partaideek eskerrak eman nahi dizkiete Europar Batasunari (Horizon 2020 programa barruan, *Monolithic batteries for spaceship applications* (687561) proiektua) eta Eusko Jaurlaritzari (Elkartek 2017) lan hau aurrera eramateko beharrezko dirulaguntzagatik.

Brownmilleritaren $\text{Ca}_2\text{AlFeO}_5$ propietate elastikoak

Aretxabaleta, Xabier M.¹; Manzano, Hegoi² eta Etxebarria, Iñigo¹

¹ Fisika Aplikatua II Saila, Zientzia eta Teknologia Fakultatea, UPV/EHU

² Materia Kondentsatuaren Fisika Saila, Zientzia eta Teknologia Fakultatea, UPV/EHU

xabier.mendez@ehu.eus

Laburpena

Brownmilleritaren ($\text{Ca}_2\text{AlFeO}_5$) propietate elastikoak aurretik kalkulatuak izan dira esperimentalki eta teorikoki. Hauen artean zegoen desadostasun handia gainditzeko, lan honetan lehen printzipioetatik kalkulatu dira mineral honen propietate elastikoak. Horretarako, dentsitate funtzionalaren (DFT) teoria erabili da. Mineral honek garrantzi handia du perovskiten hutsuneen limitea delako. Hori dela eta, kalkulatuak propietate elastikoak CaTiO_3 perovskitarekin konparatu dira hutsuneen eragina aztertzeko. Gainera, propietate elastikoen zergatia hobeto ulertzeko asmoarekin egitura elektronikoa ere kalkulatu da. Egitura elektronikoaren barnean, egoera-dentsitatea eta orbital kristalinoen gainezarpenaren populazioa kalkulatu dira.

Hitz gakoak: Brownmillerita, lehen printzipioetan oinarritutako kalkuluak, materialeen propietateak

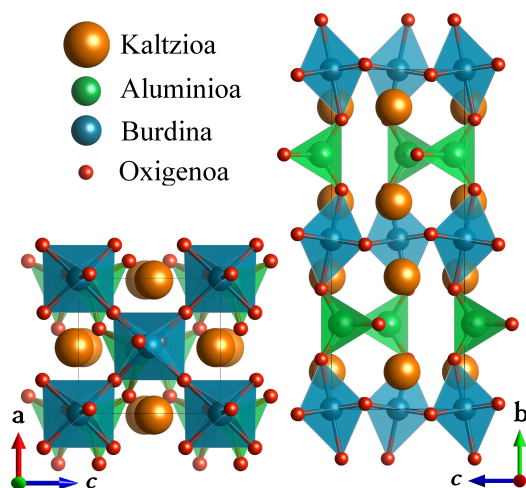
Abstract

The elastic properties of brownmillerite $\text{Ca}_2\text{AlFeO}_5$ were calculated before both computationally and experimentally showing considerable disagreement between them. To overcome this problem, in this work those properties are calculated from first principles using density functional theory (DFT). Since brownmillerite is the limit case of oxygen vacancies in perovskites, the elastic properties are compared with those of CaTiO_3 perovskite. Moreover, electronic structure of brownmillerite is analyzed by calculating the density of states and the crystal orbital overlap population.

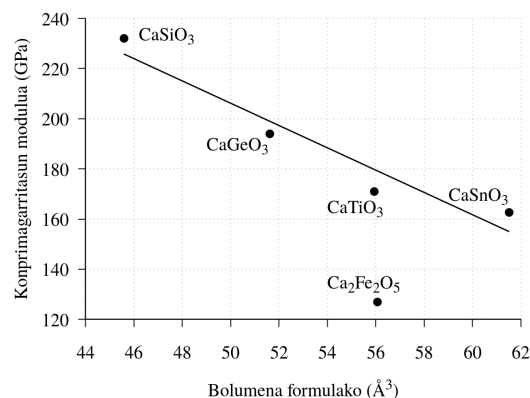
Keywords: Brownmillerite, first principles calculations, material properties

1. Sarrera eta motibazioa

Brownmillerita, $\text{Ca}_2\text{AlFeO}_5$, naturan topatu daitekeen minerala da. Mineral hau tenperatura altuetan metamorfismo termikoa jasaten duten kareharri blokeen artean eratzen da. Hori dela eta, harri bolkanikoetan agertu ohi da. Egituraren ikuspuntutik, brownmilleritak simetria ortorronbikoa du (Ibm2) (Redhammer *et al.*, 2004) eta CaTiO_3 perovskitaren oxigeno hutsuneen limitea da. Hau da, CaTiO_3 perovskitan Ti atomokoek oktaedroak osatzen dituzte O atomoekin eta Ca katioiak oktaedro hauen tartean kokatzen dira. Brownmilleritaren egiturari, Ti^{4+} atomoak Fe^{3+} eta Al^{3+} atomoengatik ordezkatzeko dira. Halarik ere, kargaren oreka mantendu dadin O atomo bat kendu egin behar da Fe edo Al atomoa ordezkatzeko. Honenbestez, ordezkapenak hurrengo erreakzioak jarraitzen dituzte: $2\text{Ti}^{4+} = 2\text{Fe}^{3+} + \text{V}_\text{O}$ eta $2\text{Ti}^{4+} = 2\text{Al}^{3+} + \text{V}_\text{O}$ non V_O -k oxigeno hutsunea adierazten duen. Ordezkapen hauek tetraedroak sortzen dituzte oxigeno hutsuneak dauden lekuetan. Hutsune hauen ulermena oso garrantzitsua da perovskitak asko erabiltzen baitira eguneroko bizitzan. Adibidez, perovskitak zelula fotoboltaikoetan, hondakin radiaktiboak geldiarazteko diseinatutako harri sintetikoetan (Synrock), lurreko behe-mantuan eta laserretan erabiltzen dira. Gainera, brownmillerita egunero erabiltzen den Portland zementuan agertzen da. Esperimentalki aurretik ikusi den moduan (Velez *et al.*, 2001) brownmilleritan Al atomoak tetraedroetan kokatzen dira eta Fe atomoak oktaedroetan. Beraz, 1. irudian adierazten den moduan, brownmilleritaren egiturak txandakako bi geruza ditu *b* norabidean zehar. Bata FeO_6 oktaedroz osatua eta bestea AlO_4 tetraedroz osatua. Gainera, AlO_4 -ko tetraedroek kateak osatzen dituzte a norabidean zehar.



1. irudia. Brownmillerita $\text{Ca}_2\text{AlFeO}_5$ -en egitura. Alumi-lumenarekiko. (Ross *et al.*, 2002; Ross eta Angel, 1999; nio eto burdinen atomoetan dauden geruzak euren koor-Kung *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 1996) dinazioa adierazten dute.



2. irudia. Ca-arekin eratzen diren perovskiten eta brownmillerita $\text{Ca}_2\text{Fe}_2\text{O}_5$ -ren konprimagarritasun modulua bo-

2. Arloko egoera eta ikerketaren helburuak

Brownmilleritaren propietate elastikoak aurretik Velez *et al.*-ek kalkulatu zituzten nanoindentazio teknika esperimentala erabiliz. Haiek lortutako Young-en modulua (E) 125 GPa-ekoa da. Geroago, $\text{Ca}_2\text{Fe}_2\text{O}_5$ -en, antzekoa den brownmilleritaren, konprimagarritasun modulua kalkulatu zen (Ross *et al.*, 2002) eta 2. irudian ikusi daitekeenez, konprimagarritasun modulu hau oso baxua da Ca-arekin eratzen diren beste perovskitekin alderatzen badugu. Konprimagarritasun modulu horren jaitziera hobeto ulertzeko lan honetan propietate elastikoak kalkulatu dira dentsitate-funtzionalaren teoria erabiliz. Gainera, egitura elektronikoaren azterketa egin da hutsuneen eragina aztertzeko. Horretarako egoera- dentsitatea eta orbital kristalinoen gainezarpenaren populazioa kalkulatu dira desegonkortasuna sortu ditzakeen lotura ez-lotzaileak bilatzeko

3. Ikerketaren Muina

3.1. Metodo konputazionalak

Dentsitate-funtzionalaren teoria burutzeko orbital atomikoen konbinazio linealaz (LCAO) baliatzen den SIESTA (Soler *et al.*, 2002) kodea erabili da. Aukeratutako funtzionala Perdew-Burke-Ernzerhof (PBE) (Perdew *et al.*, 1996) da proiektatutako uhin zabalduek (projected augmented wave, PAW) pseudopotentzialekin. Gainera, balentzia elektroiek deskribatzeko polarizazio bikoitzeko oinarriak (DZP) erabili dira. Kalkulu guztietan Monkhorst-Pack araberako k puntuen sarea erabili da $0.05 \text{ \AA}^{-1}$ -eko tartearekin.

Propietate elastikoak kalkulatzeko deformazio-tentsio metodoa (Yao *et al.*, 2007) erabili da. Hau burutzeko, deformazio desberdinak (ϵ_i) aplikatu zaizkio mineralari gelaxka parametroen %1-eko pausuetan –%3-tik (kontrakzioa) +%3-ra (espantsioa). Deformazio hau erlaxatutako gelaxkari aplikatuz gero, sortzen den tentsio tentsorea kalkula daiteke energiaren deribatuarekin $\sigma_i = \partial U / \partial \epsilon_i$. Aipatu behar da tentsio, deformazio eta koefiziente elastikoen tentsoreak definitzeko Voigt-en izendapena erabili dela. Deformazio eta tentsio tentsoreak erlazionatu ditzakegu Hooke-en ekuazioa tentsorialarekin

$$\sigma_i = \sum_{j=1}^6 C_{ij} \epsilon_j \quad (1)$$

non C_{ij} osagaia zurruntasun koefiziente elastikoak diren. Behin datu guztiak edukita, C_{ij} koefizienteak erregresio linealaren bitartez kalkulatuak izan dira.

C_{ij} koefizienteak erabilita, konprimagarritasun modulua (K), Young-en modulua (E), zizaila modulua eta Poisson-en ratioa (η) kalkulatu daitezke Voigt-Reuss-Hill-en (VRH) definizioaren arabera:

$$\begin{aligned} K &= (K_V + K_R)/2, \\ E &= 9KG/(3K + G), \\ G &= (G_V + G_R)/2 \quad \text{eta} \\ \eta &= (3K - 2G)/(2(3K + G)) \end{aligned} \quad (2)$$

non Voigt-en eta Reuss-en adierazpenak konprimagarritasun eta zizaila moduluentzat hauek diren:

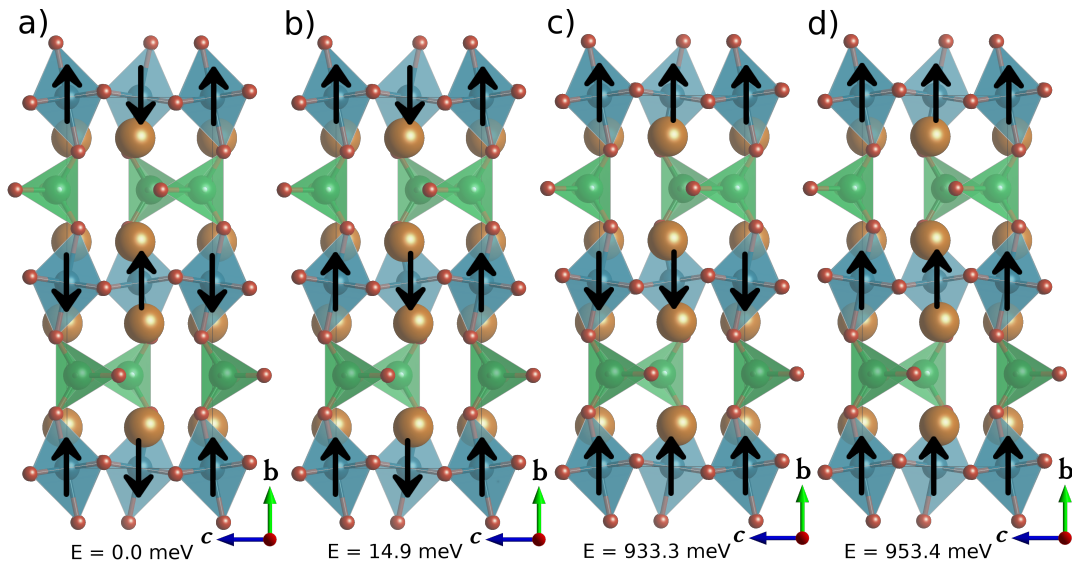
$$\begin{aligned} K_V &= \frac{1}{9} [(C_{11} + C_{22} + C_{33}) + 2(C_{12} + C_{13} + C_{23})], \\ G_V &= \frac{1}{15} [C_{11} + C_{22} + C_{33} - C_{12} - C_{13} - C_{23} + 3(C_{44} + C_{55} + C_{66})], \\ K_R &= [(S_{11} + S_{22} + S_{33}) + 2(S_{12} + S_{13} + S_{23})]^{-1} \text{ and} \\ G_R &= 15 [4(S_{11} + S_{22} + S_{33} - S_{12} - S_{13} - S_{23}) + 3(S_{44} + S_{55} + S_{66})]^{-1} \end{aligned} \quad (3)$$

eta S_{ij} malgutasun koefiziente elastikoak diren.

3.2. Magnetizazio ordena

Egindako kalkuluak zehaztasun handiagoa izan dezaten, magnetizazioa kontuan hartu da spin polarizatuen densitate funtzionalaren teoria erabiliz. Aurretik jakina zen $\text{Ca}_2\text{Fe}_2\text{O}_5$ G motako anti-ferromagnetikoa dela (Takeda *et al.*, 1968). Halarik ere, $\text{Ca}_2\text{AlFeO}_5$ -en spin ordena anti-ferromagnetiko guztien (G mota, C mota eta A mota) eta spin ordena ferromagnetikoaren energiak kalkulatu dira energia minimoko egoera zein den ikusteko. 3. irudian azaltzen denez, G motako ordena anti-ferromagnetikoa da energia baxuena duena. Gainera, ikusi daiteke aluminio geruzen arteko spin ordenak ez duela influentzia askorik energian. Beraz, G motako ordena anti-ferromagnetikoa erabili da kalkulu guztietarako.

3. irudia. Brownmilleritak eduki dezakeen Fe spin ordena ezberdinak eta bakoitzaren energia. a) G mota anti-ferromagnetikoa, b) C mota anti-ferromagnetikoa, c) A mota anti-ferromagnetikoa eta d) ferromagnetikoa.



1. taula. Perovskitaren (CaTiO_3) (Boudali *et al.*, 2010) eta brownmilleritaren ($\text{Ca}_2\text{FeAlO}_5$) zurruntasun koefiziente elastikoak GPa-tan.

	CaTiO_3	$\text{Ca}_2\text{AlFeO}_5$
C_{11} (GPa)	317	232(-%27)
C_{22} (GPa)	324	197(-%39)
C_{33} (GPa)	333	237(-%28)
C_{44} (GPa)	119	64(-%46)
C_{55} (GPa)	110	58(-%47)
C_{66} (GPa)	116	69(-%40)
C_{12} (GPa)	123	71(-%42)
C_{13} (GPa)	108	78(-%27)
C_{23} (GPa)	99	91(-%8)

3.3. Egitura kristalinoa

Lehenik eta behin egitura erlaxatu da gradiente konjokatuen metodoa erabiliz. Hau eginda, hurrengo gelaxka parametroak lortu dira: $a = 5.43\text{\AA}$, $b = 14.53\text{\AA}$, $c = 5.70\text{\AA}$ eta $\alpha = \beta = \gamma = 90.0^\circ$. Balio hauek X izpien bidez kalkulaturako balioekin alderatu daitezke $\text{Ca}_2(\text{Fe}_{2-x}\text{Al}_x)\text{O}_5$ egiturarako $x = 0.986$ denean (Redhammer *et al.*, 2004). Esperimentu honetan balio hauek lortu zituzten: $a = 5.34\text{\AA}$, $b = 14.49\text{\AA}$, $c = 5.55\text{\AA}$ eta $\alpha = \beta = \gamma = 90.0^\circ$. Beraz, dentsitate-funtzionalaren teoriak emandako emaitzak onargarriak dira balio esperimentalekin %3-ko baino errore txikiagoa baitute. Hala ere, metodo honek a , b eta c parametroak handizkatu egiten ditu baina hau oso normala da DFT-PBE kalkuluetan (Perdew *et al.*, 1992).

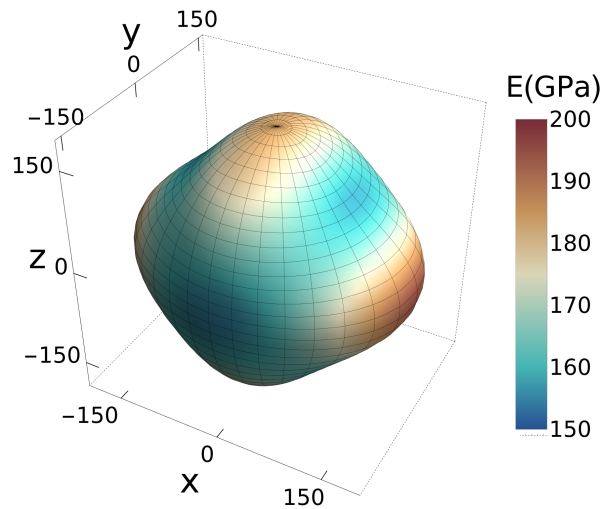
3.4. Propietate elastikoak

Brownmilleritaren propietate elastikoak kalkulatzeko aurreko atalean aipaturako deformazio- tentsio metodoa erabili da. Egitura kristalinoa ortorronbikoa denez eta beraz ortotropikoa, 9 dira zurruntasun koefiziente elastiko ez-nuluak. Metodo horrekin lortutako zurruntasun koefiziente elastikoak 1. taulan adierazita daude. Tentsore elastiko horrekin konprimagarritasun moduluak eta Young-en moduluak balio hauek dituzte hurrenez hurren: $K=127$ GPa eta $E=169$ GPa. Kalkulatutako Young-en modulua esperimentalki kalkulaturakoa ($E=125$ GPa) baino handiagoa dela ikusi daiteke (Velez *et al.*, 2001). Desberdintasun hau esperimentalki neurtutako laginaren ezpurutasunengatik, porositatearengatik edota lehentasunezko norabideengatik eman daiteke. Azken hau aztertzeko 4. Irudian Young-en moduluaren balioa irudikatu da norabide bakoitzean (Marmier *et al.*, 2010). Irudiari so eginez, XZ norabidean eta Y norabidean Young-en modulua txikiagoa dela esan dezakegu eta ondorioz, minerala norabide horietan ahulagoa izango da. Gainera, tentsore elastikoko koefizienteak CaTiO_3 -ren koefizienteekin konparatzen badira (1. taula) XZ norabidearekin lotuta dagoen C_{55} koefizientearen diferentzia handia dagoela ikus dezakegu. Hala eta guztiz, lortutako konprimagarritasun moduluaren balioa $\text{Ca}_2\text{Fe}_2\text{O}_5$ -erako lortutako balioaren (Ross *et al.*, 2002) antzekoa da eta Ca-arekin eratzen diren beste perovskitena baino txikiagoa izaten jarraitzen du.

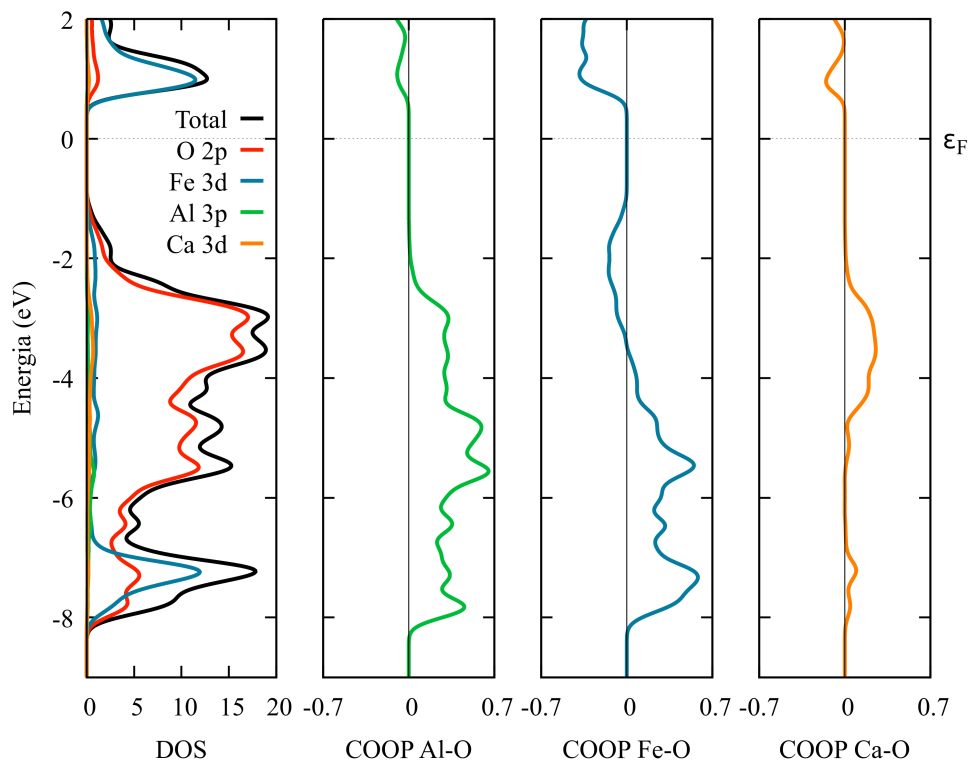
3.5. Egitura Elektronikoa

Brownmilleritan dauden oxigeno hutsuneek sortzen duten eragina ikusteko egitura elektronikoa aztertu da. Horretarako, egoera-dentsitatea (DOS) eta orbital kristalinoen gainezarpen-populazioa (COOP) kalkulatu dira (Dronskowski, 2008). COOP kurbak bi orbitalen egoera-dentsitatea bider euren arteko gainezarpen- populazioa (bi orbitalen arteko gainezarpen integralarekin zerikusia duena) eginez kalkulatu dira. Beraz, COOP kurba positiboa bada lotura lotzailea da eta negatiboa bada lotura ez-lotzailea. 5. Irudian azaltzen den moduan, egoera-dentsitatean fermi mailaren aurretik dauden azken bandak oxigenoaren 2p orbitalari dagozkio. Are gehiago, oxigeno banda horiek Ca, Al eta Fe atomoekin gainezarpen txikia daukate. Ikusteko ea gainezarpen hori lotzailea edo ez-lotzailea den, COOP kurbei so egin behar zaie. Hauei begiratuta, esan daiteke Al-O eta Ca-O loturak lotzaile direla (euren gainezarpenera positiboa delako) eta aldiz Fe-O loturak ez-lotzaileak direla (gainezarpenera negatiboa delako). Azken hauek ezegonkortasuna sortzen dute materialean. 1. irudian ikusi daitekeen moduan, lotura ez-lotzaile horiek, Fe-O loturak hain zuzen ere, XZ eta Y norabidean ematen dira. Horrek, 1. taulan adierazi den moduan, norabide horiek lotuta dagoen tentsore elastikoko koefizienteen, C_{55} eta C_{22} -ren, jaitsiera nabarmena dakar CaTiO_3 perovskitarekin konparatuz. Beraz, esan genezake hutsuneek XZ eta Y planoan lotura ez-lotzaileak sortzen dituztela eta ondorioz solidoa ahulagoa dela norabide horietan.

4. irudia. Brownmilleritaren Young-en modulua norabide guztietan.



5. irudia. Brownmilleritaren egoera-dentsitatea eta Ca-O, Fe-O eta Al-O atomo bikoteen orbital kristalinoen gainezarpen-populazioa. Azken hauetan balio positiboak lotura lotzailea adierazten du eta balio negatiboak lotura ez-lotzailea.



4. Ondorioak

Lan honetan brownmilleritaren ($\text{Ca}_3\text{AlFeO}_5$) propietate elastikoak kalkulatu dira dentsitate- funtzionalaren teoria erabiliz. Emaitzetan ikusi daiteke hutsuneen efektuak asko jaisten duela konprimagarritasun modulua kaltzioarekin eratzten diren beste perovskitekin konparatuz. Hala ere, konputazionalki kalkulaturako Young-en moduluak esperimentalki kalkulaturakoa baino %35 handiagoa da. Hau, lehen esan den moduan, esperimentalki neurtuta-

ko laginaren ezpurutasunengatik, porositatearengatik edota lehentasunezko norabideengatik eman daiteke. Ordea, potentzial enpirikoekin kalkulaturako Young-en moduluekin konparatzen bada (Tavakoli eta Tarighat, 2016), lan honetako emaitza askoz hobea da.

Beste alde batetik, brownmilleritaren magnetizazio ordena aztertu da eta G ordena anti-ferromagnetikoa duela aurkitu da. Gainera, geruza desberdinen arteko ordena magnetikoak oso eragin txikia du energian.

Young-en modula norabide guztietan aztertzerakoan (4. irudia), antzematen da XZ norabidea dela Young-en modulu txikiena duena. Horrez gain, lortutako tentsore elastikoaren koefizienteak CaTiO_3 perovskitarekin konparatzen badira (1. taula) ikus daiteke zehazki XZ eta Y norabidean (C_{55} eta C_{22} koefizienteak) agertzen dela diferentzia handiena. Horrek esan nahi du hutsuneen eraginak ahulezia sortzen dutela brownmilleritaren norabide horietan.

Gainera, egitura elektronikoa aztertuz, ikusten da oxigeno eta burdinaren arteko loturak ez- lotzailek direla eta beraz desegonkortasuna sortzen dutela. Are gehiago, desegonkortasun hori XZ eta Y norabidean dagoela antzematen da, norabide horretan baitaude Fe-O loturak. Honek zentzua dauka lortu diren tentsore elastikoaren koefizienteekin. Beraz, Young-en modulua XZ eta Y norabidean txikiagoa izateak oxigeno eta burdinaren arteko lotura ez-lotzailekin zerikusia duela esan daiteke.

5. Etorkizunerako planteatzen den norabidea

Lan honek oxigeno hutsuneen eragina aztertzen du brownmilleritan propietate elastikoetan eta egitura elektronikoan. Hobeto ikusteko oxigeno hutsuneen eragina, etorkizunean kalkulu desberdinak egin lirateke oxigeno hutsune kopuru desberdina duten perovskitekin. Horrela, hutsune horien kopuruaren eragina ikusiko genuke bai propietate elastikoetan eta egitura elektronikoetan.

Beste alde batetik, ez dago potentzial enpirikorik propietate elastiko hauek ondo deskribatzen dituenik. Beraz, egindako DFT kalkuluekin *core-shell* moduko potentzial enpirikoak doitu daitezke mineral honekin simulazio arinak egin ahal izateko.

6. Erreferentziak

- Boudali, A., A. Abada, M. Driss Khodja, B. Amrani, K. Amara, F. Driss Khodja, eta A. Elias. 2010. Calculation of structural, elastic, electronic, and thermal properties of orthorhombic CaTiO_3 . *Physica B: Condensed Matter* 405.3879–3884.
- Dronskowski, Richard. 2008. *Computational chemistry of solid state materials: A guide for materials scientists, chemists, physicists and others*. John Wiley & Sons.
- Kung, J., R. J. Angel, eta N. L. Ross. 2001. Elasticity of CaSnO_3 perovskite. *Physics and Chemistry of Minerals* 28.35–43.
- Marmier, Arnaud, Z. A. D. Lethbridge, R. I. Walton, C. W. Smith, S. C. Parker, eta K. E. Evans. 2010. Elam: A computer program for the analysis and representation of anisotropic elastic properties. *Computer Physics Communications* 181.2102–2115.
- Perdew, John P., K. Burke, eta M. Ernzerhof. 1996. Generalized gradient approximation made simple. *Physical review letters* 77.3865.
- Perdew, John P., J. A. Chevary, S. H. Vosko, K. A. Jackson, M. R. Pederson, D. J. Singh, eta C. Fiolhais. 1992. Atoms, molecules, solids, and surfaces: Applications of the generalized gradient approximation for exchange and correlation. *Phys. Rev. B* 46.6671–6687.
- Redhammer, Gunther J., G. T. Toppelt, G. Roth, eta G. Amthauer. 2004. Structural variations in the brownmillerite series $\text{Ca}_{2-x}\text{Al}_x\text{O}_5$: Single-crystal x-ray diffraction at 25° C and high-temperature x-ray powder diffraction (25°C–1000°C). *American Mineralogist* 89.405–420.
- Ross, Nancy L., R. J. Angel, eta F. Seifert. 2002. Compressibility of brownmillerite ($\text{Ca}_2\text{Fe}_2\text{O}_5$): effect of vacancies on the elastic properties of perovskites. *Physics of the earth and planetary interiors* 129.145–151.
- , eta R. J. Angel. 1999. Compression of CaTiO_3 and CaGeO_3 perovskites. *American Mineralogist* 84.277–281.
- Soler, José M., E. Artacho, J. D. Gale, A. García, J. Junquera, P. Ordejón, eta D. Sánchez-Portal. 2002. The siesta method for ab initio order-n materials simulation. *Journal of Physics: Condensed Matter* 14.2745.

- Takeda, Takayoshi, Yasuo Yamaguchi, Shoichi Tomiyoshi, Masahiro Fukase, Mitsuo Sugimoto, eta Hiroshi Watanabe. 1968. Magnetic structure of $\text{Ca}_2\text{Fe}_2\text{O}_5$. *Journal of the Physical Society of Japan* 24.446–452.
- Tavakoli, Davoud, eta Amir Tarighat. 2016. Molecular dynamics study on the mechanical properties of portland cement clinker phases. *Computational Materials Science* 119.65–73.
- Velez, Karine, Sandrine Maximilien, Denis Damidot, Gilbert Fantozzi, eta Francois Sorrentino. 2001. Determination by nanoindentation of elastic modulus and hardness of pure constituents of portland cement clinker. *Cement and Concrete Research* 31.555–561.
- Wang, Yanbin, Donald J Weidner, eta François Guyot. 1996. Thermal equation of state of CaSiO_3 perovskite. *Journal of Geophysical Research: Solid Earth* 101.661–672.
- Yao, Hongzhi, Lizhi Ouyang, eta Wai-Yim Ching. 2007. Ab initio calculation of elastic constants of ceramic crystals. *Journal of the American Ceramic Society* 90.3194–3204.

7. Eskerrak eta oharrak

Eskertzen da Eusko Jaurlaritzako Hezkuntza, Hizkuntza Politika eta Kultura Sailaren laguntza ekonomikoa (IT912-16 eta IT779-13) eta IZO-SGI, SGIker-ek (UPV/EHU, MICINN, GV/EJ, ERDF and ESF)-ek emandako laguntza teknikoa. Eskerrak ere ELKARTEK proiektuari. X.A.-k UPV/EHU-ri (PIF17/118) eskertu nahi dio babes ekonomikoa.

Ekialdeko Kantauriar Itsasoko kostaldeko partikula exopolimeriko gardenen (PEG) urtean zeharreko bilakaera

Uranga, Ainhoa^{1*}; Abad, Naiara^{1*}; Azua, Iñigo¹; Artolozaga, Itxaso¹; Baña, Zuriñe¹; Unanue, Marian¹ eta Ayo, Begoña^{1,2}

*egile hauen ekarpena berdina izan zen

¹*Immunologia, Mikrobiologia eta Parasitologia saila. Zientzia eta Teknologia Fakultatea, Euskal Herriko Unibertsitatea, UPV-EHU*

²*Itsas Biologia eta Bioteknologia Esperimentalen Ikerketa Zentroa. PiE-UPV-EHU*

naiara.abad@ehu.eus

Laburpena

Partikula exopolimeriko gardenak (PEG) ozeanoetako zeluletatik kanpoko substantzia polimeriko ugariak dira. Karbonoaren ponpa biologikoan, aire-itsaso elkarrekintzan eta mikrobio-sareetan duten eragina dela eta, prozesu biogeokimikoetan eta ekologikoetan garrantzia handia dute. PEG-en sorrera biotikoa zein abiotikoa izan daitekeen arren, beraien iturri garrantzitsuena fitoplanktonak jariaturiko polisakaridoen koagulazioa da. Partikula hauen sortze- eta desagertze-prozesuen konplexutasun handiaren ondorioz, zaila da PEG-en bilakaera auresatea. Lan honetan PEG-en kontzentrazioak eta bilakaera aztertu dira Armintzako itsas-estazioan, Ekialdeko Kantauriar Itsasoan kokatuta dagoena. Urte baten buruan 11 laginketa egin ziren, zeintzuetan PEG-en kontzentrazioaz gain, bestelako aldagai fisikoak, kimikoak eta biologikoak neurtu ziren, beraien arteko ustezko erlazioan sakontzeko asmoz. Sistema honetako PEG-en kontzentrazioaren faktore erregulatzailer nagusienak *a* klorofiladun fototrofoen eta prokariotoen dentsitateak dira.

Hitz gakoak: partikula exopolimeriko gardenak (PEG), karbonoaren ponpa biologikoa, *a* klorofila, fototrofoak, prokarioto heterotrofoak, Ekialdeko Kantauriar Itsasoa.

Abstract

*Transparent exopolymer particles (TEPs) are the most abundant subclass of organic particles in the ocean. They have a high impact in biogeochemical cycles and ecological processes of the ocean, such as the biological carbon pump, air-sea interactions and the microbial loop. Although they are formed from different biotic and abiotic processes, coagulation of polysaccharides exuded by phytoplankton is their main source of production. The complexity in their production and consumption make TEP dynamics hardly predictable. In the present work, we study the TEP concentration and temporal evolution in the Armintza coastal station (Eastern Cantabrian Sea). In 11 seawater samples collected during one year, we measured the TEP concentration together with several physicochemical and biological parameters in order to detect any relationship among them. In this system, TEPs were closely related to and probably regulated by the abundances of phototrophic microorganisms rich in chlorophyll *a*, in particular *Synechococcus cyanobacteria*, and heterotrophic prokaryotes.*

*Keywords: Transparent exopolymer particles (TEP), biological carbon pump, chlorophyll *a*, phototrophs, heterotrophic prokaryotes, Eastern Cantabrian Sea.*

1. Sarrera eta motibazioa

Partikula exopolimeriko gardenak (PEG), fitoplanktonak eta prokarioto heterotrofoek ur ingurunera jariaturiko exudatuaren agregazioaren ondorioz sorturiko partikula organiko abiotikoak dira (Alldredge et al., 1993). Oro har, 0,45-300 µm bitarteko tamaina izan dezakete (Passow, 2002) eta edozein ekosistema urtarretan ager daitezkeen arren, ozeanoetako ekosistema pelagikoetan dira ugariak. Gehienbat izaera azidoa duten mono- eta polisakaridoz

(karboxilaturiko edota sulfaturiko polisakaridoz) osatuta daude. Hori dela eta, Altzian urdinaren tindaketaren bitartez ikusgarriak dira eta ezaugarri fisiko-kimiko bereziak dituzte, likintasan handia besteak beste (Alldredge et al., 1993). Honi esker, inguruko konposatu organiko eta ez-organikoen agente-itsaskor bezala jardun dezakete egitura konplexuagoak (makropartikulak) sortuz (Passow eta Alldredge, 1994).

Itsas-ekosistemetan PEG-en eraketa bi modutan gerta daiteke. Alde batetik, modu abiotikoan, hazkuntza aktiboa duten edota seneszentzia fasean dauden mikroorganismoek jariatutako aitzindarien koagulazioaren ondorioz (Passow, 2002), eta bestetik, organismo planktoniko desberdinek (fitoplanktona, prokariotoak, protozoak eta birusak) PEG-en sorrera biologikoan parte har dezakete (Wurl et al., 2017). Hauen artean, fitoplanktona eta prokariotoak dira ekoizle nagusiak (Ortega-Retuerta et al., 2010). Hala ere, bibliografian aurki daitezkeen urtaroko bilakaerek ez dute eredu berdina jarraitzen. Adibidez, itsas-sistema batzuetan PEG-en kontzentrazioa eta *a* klorofilaren kontzentrazioa batera aldatzen direla ikusi den arren (Beauvais et al., 2003; Scoullon et al., 2006; Busch et al., 2017; Parinos et al., 2017), beste itsas-sistemetan ez da joera berdina ikusi (Bhaskar eta Bhosle, 2006; Taylor et al., 2014) edo urtean zehar sasoi batzuetan baino ez dira batera aldatu (Dreshchinskii eta Engel, 2017). Prokariotoen dentsitatea PEG-ekin erlazionatu bada ere, haien arteko erlazioa zehaztea konplexuagoa da, aldi berean hauen sortzaileak (Guerrini et al., 1998) eta degradatzaileak (Bar-Zeev et al., 2011) izan daitezkeelako.

Itsas-gainazaletik partikula hauen desagerpena itsas-hondorantz gertatzen den garraioaren bidez edota degradazio-prozesuen bidez gerta daiteke. Degradazio-prozesuei dagokienez, fotolisiaren bidez (Ortega-Retuerta et al., 2009) edo prokariotoen zelulaz kanpoko jarduera entzimatikoen bidez (Smith et al., 1992) gertatzen da. Itsasoa oso sistema oligotrofikoa izanda eta partikula hauek karbonoan aberatsak direnez, prokariotoek aktiboki kolonizatu egiten dituzte elikagaiak lortzeko helburuarekin (Bar-Zeev et al., 2011; Taylor et al., 2014). Horrela, partikula hauei itsatsitako prokariotoek buruturiko zelulaz kanpoko liseriketa handiaren ondorioz, partikuletatik ingurunera elikagaiak barreiatzen dira fase likidoan dauden bizitza askeko prokariotoen hazkuntza-abiadura areagotuz (Simon et al., 2002).

2. Arloko egoera eta ikerketaren helburuak

Itsas-ekosistemetan PEG-en denbora luzeko behaketak egitea garrantzitsua da. Batetik, ziklo biogeokimikoen ezagutza sakondu ahal izateko. Bestetik, kostaldeko ekosistemetan ingurumen-inpaktu handia izan dezaketelako (uraren kalitatean zuzenean eraginez edo gatzgabetzeko instalazioetan alderantzizko osmosi-iragazkiak asetuz) (Berman, 2013). Orain arte, mota honetako 5 ikerketa bakarrik ezagutzen ditugu eta oraindik partikula hauen erregulazioari buruzko emaitzak kontraesankorrak dira.

Lan honen helburu nagusia Armintzako kostaldeko estazioan partikula exopolimeriko gardenen (PEG) kontzentrazioa zehaztea eta beraien aldakortasunean zerikusia izan dezaketen aldagai fisiko-kimikoak eta biologikoak aztertzea izan da.

3. Ikerketaren muina

3.1. Laginketa eta aldagai desberdinen neurketa

Ekialdeko Kantauriar Itsasoan kokatuta dagoen Armintzako kostaldeko estazioan (43° 44' N, 2° 90' W) laginak hartu ziren 2017ko uztailetik 2018ko uztailera arte, guztira 11 laginketa eginez. Itsas-azaleko ura jaso eta tenperatura, eroankortasuna eta gazitasuna neurtu ziren *in situ* eroankortasun neurgailua erabiliz. Ondoren, ura azido klorhidrikoarekin garbitutako polietilenoazko bidoietan eta iluntasunean eraman zen EHUKo Mikrobio Itsastarrak Ikerketa Taldeko laborategira.

Itsas-laginak karakterizatzeko, laborategian hainbat aldagairen neurketak egin ziren, hurrengo taulan adierazi direnak (1. taula).

1. taula. Itsas-laginak karakterizatzeko neurtu ziren aldagai fisiko-kimikoak, biologikoak eta fisiologikoak.

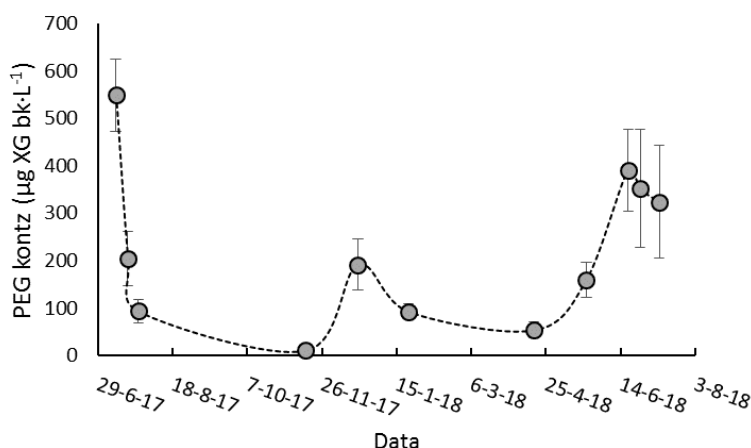
Aldagai fisiko-kimikoak	Aldagai biologikoak	Aldagai fisiologikoak
Tenperatura (°C)	<i>a</i> klorofilaren kontzentrazioa ($\text{mg} \cdot \text{m}^{-3}$)	Prokarioto heterotrofoen biomasaren ekoizpen-abiadura ($\mu\text{gC} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{egun}^{-1}$)
Gazitasuna (ppt)	<i>Synechococcus</i> -en dentsitatea ($\text{zel} \cdot \text{mL}^{-1}$)	Prokarioto heterotrofoen arnasketa-abiadura ($\mu\text{gC} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{egun}^{-1}$)
Eroankortasuna ($\mu\text{S} \cdot \text{cm}^{-1}$)	Nano- eta pikofitoplankton eukariotoaren dentsitatea ($\text{zel} \cdot \text{mL}^{-1}$)	Prokarioto heterotrofoen hazkunde-efizientzia (%)
Materia organikoaren fluoreszentzia (QSU)	Nanoflagelatu heterotrofoen eta prokariotoen dentsitateak ($\text{zel} \cdot \text{mL}^{-1}$)	Zelulaz kanpoko jardura entzimatioko abiadura ($\text{nM} \cdot \text{h}^{-1}$)

3.2. PEG-en kontzentrazioaren urtean zeharreko aldakortasuna

PEG-en kontzentrazioaren kuantifikazioa metodo kolorimetrikoaren bidez egin zen Passow-ek eta Alldredge-k proposatu zuten bezala (1995). Honen arabera, 500-800 ml bolumeneko sei erreplika $0,45 \mu\text{m}$ -ko poro-tamaina zuten iragazkietatik pasarazi ziren PEG-ak kontzentratzeko eta Altzian urdinez tindatu ziren. Azido sulfurikoan disolbatu ondoren, espektrofotometroaren bidez absorbantziak neurtu ziren 787 nm -ko uhin-luzeran. PEG-en kontzentrazioa kalkulatzeko, Xantano Gomazko disoluzioaren absorbantzia-neurketetan oinarritutako kalibrazio-lerroa erabili zen. Emaitza gordinak μg Xantano Goma baliokide $\cdot \text{L}^{-1}$ moduan ($\mu\text{g XG bk} \cdot \text{L}^{-1}$) adierazi ziren.

Armintzako estazioan jasotako laginen PEG-en kontzentrazioek oso aldakortasun nabarmena adierazi zuten (1. irudia), balioak 11tik $549 \mu\text{g XG bk} \cdot \text{L}^{-1}$ -rako kontzentrazio-tartean egon zirelarik. Urtean zeharreko bilakaeran, balioen hiru igoera nabarmen detektatu ziren: lehenengoa 2017ko uztailan ($\bar{x} = 549 \pm 44 \mu\text{g XG bk} \cdot \text{L}^{-1}$), bigarren leunago bat abenduan ($\bar{x} = 191 \pm 24 \mu\text{g XG bk} \cdot \text{L}^{-1}$) eta, azkenik, 2018ko udaberri bukaera-uda hasierakoa ($\bar{x} = 391 \pm 44 \mu\text{g XG bk} \cdot \text{L}^{-1}$). Aipagarria da balio altu horien ondoren PEG-en kontzentrazioek beherakada handia izan zutela hiru kasuetan.

1. irudia. Armintzako estazioan hartutako laginen PEG-en batezbesteko ($\pm$ d. e.) kontzentrazioaren bilakaera.

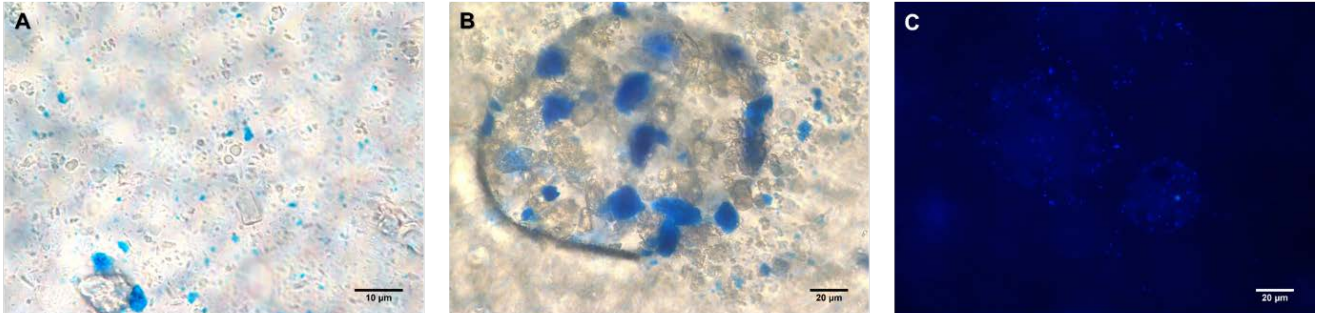


3.3. PEG-en behaketa mikroskopikoa

Altzian urdinez tindaturiko (Passow eta Alldredge, 1995) eta mikroskopio optikotik begiraturiko PEG-en irudietan ikus daitekeenez (2A eta 2B irudiak), sistema honetako partikula hauek oso tamaina aldakorrekoak izan ziren, $<1 \mu\text{m}$ -tatik $100 \mu\text{m}$ baino handiagoetara hain zuzen ere. Horretaz gain, partikula hauek bi modutan ager daitezkeela ikusi zen, modu askean (2A irudia) edota beste izaeretako partikulei agregaturik (2B irudia), makroagregatuak sortuz.

Bestetik, DAPIz tindaturiko (Porter eta Feig, 1980) eta epifluoreszentzia-mikroskopiotik begiraturiko irudian (2C irudia), partikula hauetan prokariotoen oso dentsitate handiak zeudela hauteman zen.

2. irudia. Mikroskopia-mota desbesdinetan egindako PEG-en behaketak.



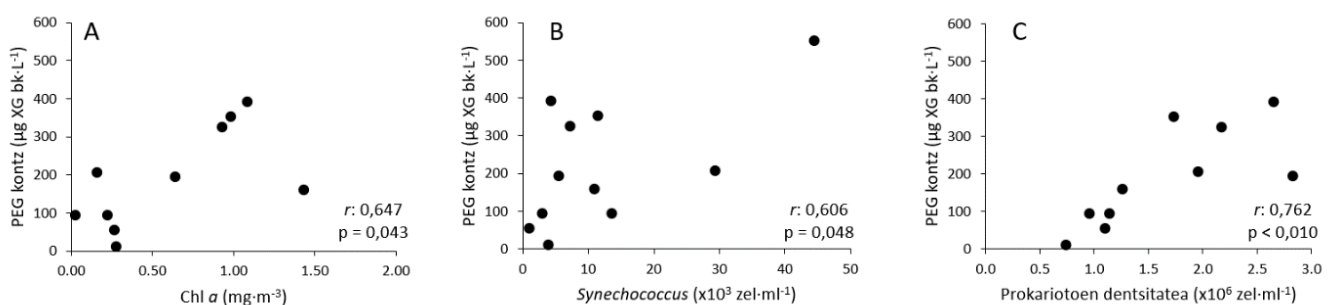
A eta B irudiak: mikroskopia optikoan egindako x1000 eta x400 behaketak, hurrenez hurren.
C irudia: epifluoreszentzia-mikroskopioan egindako x400 behaketa.

3.4. PEG-en kontzentrazioaren eta aldagai desberdinen arteko korrelazioa

Partikula exopolimeriko gardenen kontzentrazioak ez zuen ingurumen-aldagai fisiko-kimikoekin korrelazio estatistiko esangarririk izan.

Aldagai biologikoei dagokionez, gure emaitzek adierazi zuten PEG-en kontzentrazioaren eta a klorofilaren kontzentrazioaren arteko korrelazio positibo estatistikoki esangarria zegoela ($p = 0,043$, 3A irudia). PEG-en kontzentrazioak *Synechococcus*-en dentsitatearekin ($p = 0,048$, 3B irudia) eta baita prokariotoen dentsitatearekin ($p < 0,01$, 3C irudia) ere izan zituen korrelazio positibo estatistikoki esangarriak. Aldiz, ez zen aurkitu korrelaziorik nano- eta pikofitoplankton eukariotoaren dentsitatearekin ezta nanoflagelatu heterotrofoen dentsitatearekin ere.

3. irudia. PEG-en kontzentrazioaren korrelazioa a klorofilaren kontzentrazioarekin eta *Synechococcus*-en eta prokariotoen dentsitateekin.



Emaitza hauek aldeztu aurretik egindako ikerketetan esandakoarekin bat zetozenez, ondoren PEG-en kontzentrazioaren eta a klorofilaren kontzentrazioaren, *Synechococcus*-en dentsitatearen eta prokariotoen dentsitatearen arteko erregresio anizkoitza kalkulatu zen, PEG-en agertze-desagertzearen erregulatzaile garrantzitsuenetatik eredu iragarria lortzeko asmoz. Lau aldagai hauen bilakaeran oinarrituta, hurrengo ekuazioa lortu zen:

$$PEG = -76 + 120,6 \text{ Chl } a + 2,6 \text{ Syn} + 100,7 \text{ Prok}$$

(erregresio-koefizientea 0,86; $R^2=0,74$; errore tipikoa 82,23)

Non:

PEG = PEG-en kontzentrazioa ($\mu\text{g XG bk}\cdot\text{L}^{-1}$)

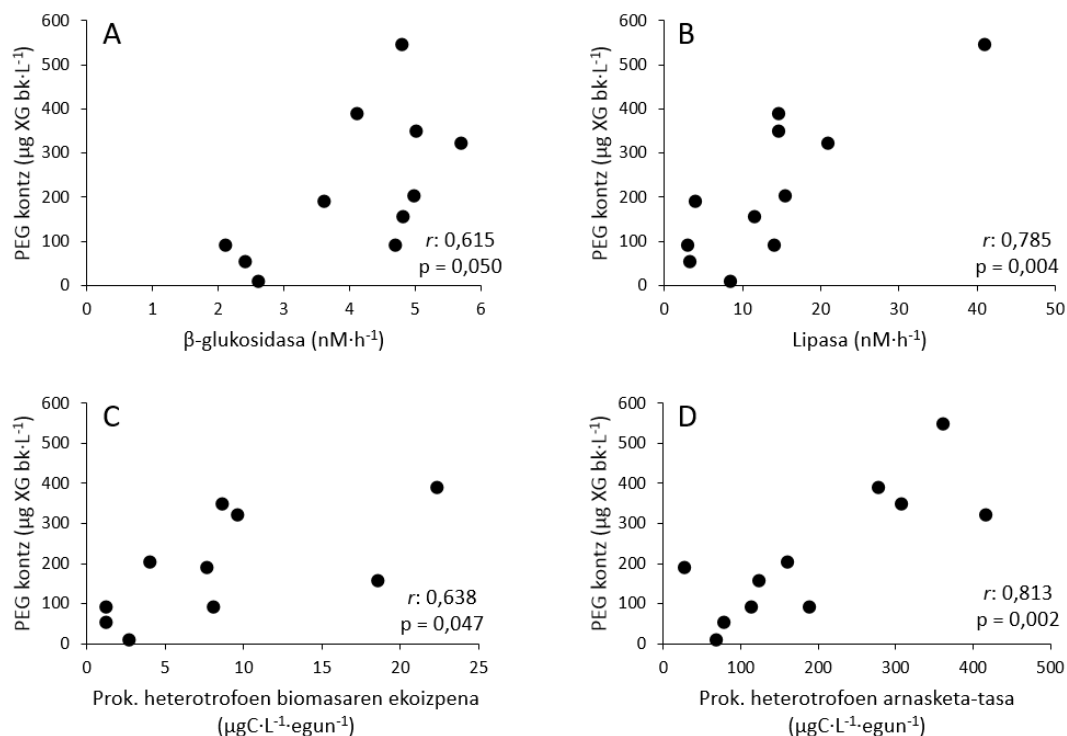
$Chl\ a$ = a klorofilaren kontzentrazioa ($\text{mg}\cdot\text{m}^{-3}$)

Syn = *Synechococcus*-en dentsitatea ($\times 10^3\ \text{zel}\cdot\text{mL}^{-1}$)

$Prok$ = Prokariotoen dentsitatea ($\times 10^6\ \text{zel}\cdot\text{mL}^{-1}$)

Azkenik, PEG-en kontzentrazioaren eta prokariotoek burutzen dituzten hiru prozesu fisiologiko nagusien (zelulaz kanpoko polimeroen hidrolisia, biomasaren ekoizpena eta arnasketa) arteko korrelazioa aztertu zen. Aztertutako zelulaz kanpoko jardura entzimatikoei dagokienez, bai β -glukosidasa bai lipasa jardueren abiadurek erlazio positiboki esanguratsua eta estua izan zuten PEG-en kontzentrazioarekin (4A eta 4B irudiak). Bestalde, PEG-en kontzentrazioa eta prokarioto heterotrofoen biomasaren ekoizpen-abiadura positiboki erlazionatuta zeudela ikusi zen (4C irudia) eta baita arnasketa-abiadura ere (4D irudia). Emaitza hauek guztiek agerian utzi zuten prokarioto heterotrofoek aktiboki kolonizatzen dituztela partikula exopolimerikoak beraietatik erauzi ditzaketen elikagaiak erabiltzeko, modu honetan beraien metabolismoa piztuz.

4. irudia. PEG-en kontzentrazioaren korrelazioa prokarioto heterotrofoek burutzen dituzten hiru prozesu fisiologiko nagusiekin: zelulaz kanpoko jardura entzimatioak, biomasaren ekoizpena eta arnasketa.



4. Ondorioak

Lan honetan lortutako emaitzen arabera, a klorofiladun fitoplanktonaren azaleratzeak (*Synechococcus* barne) PEG-en sorrerarekin edota hedapenarekin erlazionatuta daudela ikusi da. Era berean, prokariotoen hazkuntza ere susta dezaketela behatu da, PEG-en kontzentrazioaren eta prokarioto heterotrofoen dentsitatearen arteko korrelazio positiboari erreparatuz. Are gehiago, lau

aldagai hauen bilakaeran oinarrituriko eredu iragarriak partikula exopolimerikoen kontzentrazioaren aldakortasunaren %86-a azaltzen du.

Azkenik, prokariotoek buruturiko prozesu fisiologikoek PEG-en kontzentrazioaren emendioaren aurrean izan duten erantzunak agerian utzi du elkarrekintza aktibo dagoela beraien artean. Zelulaz kanpoko jarduera entzimatikoen handipena ikusi da, partikula organiko hauek mikroorganismoen hazkuntza ahalbidera dezaketen substratuen iturri gisa joka dezaketela iradokiz. Horrez gain, substratu hauen degradazioak prokariotoen biomasaren ekoizpena eta arnasketa bultza ditzake, bi aldagai metaboliko hauen eta PEG-en kontzentrazioaren arteko korrelazio positiboan islatu dena.

5. Etorkizunerako planteatzen den norabidea

2018ko uztailaz geroztik laginketak egiten jarraitu dugu aldagai biologiko zein fisiko-kimiko eta PEG-en kontzentrazioak neurtuz datu base handiagoa lortzeko helburuarekin. Datu gehiago edukitzeak, bibliografian deskribatuta dauden eta jada antzeman ditugun korrelazioak aurkitzeko aukera eman diezaguke, baita proposaturiko eredu iragarria hobetzeko aukera ere.

6. Erreferentziak

- Allredge, A. L., Passow, U., and Logan, B. E. (1993), The abundance and significance of a class of large, transparent organic particles in the ocean, *Deep. Res., Part I* 40, 1131–1140.
- Bar-Zeev, E., Berman, T., Rahav, E., Dishon, G., Herut, B., Kress, N., et al. (2011), Transparent exopolymer particle (TEP) dynamics in the eastern Mediterranean Sea, *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 431, 107–118.
- Beauvais, S., Pedrotti, M. L., Villa, E., and Lemée, R. (2003), Transparent exopolymer particle (TEP) dynamics in relation to trophic and hydrological conditions in the NW Mediterranean Sea, *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 262, 97–109.
- Berman, T. (2013), Transparent exopolymer particles as critical agents in aquatic biofilm formation: implications for desalination and water treatment, *Desalin. Water Treat.*, 51, 1014–1020.
- Bhaskar, P. V., and Bhosle, N. B. (2006), Dynamics of transparent exopolymeric particles (TEP) and particle-associated carbohydrates in the Dona Paula bay, west coast of India, *J. Earth Syst. Sci.*, 115, 403–413.
- Busch, K., Endres, S., Iversen, M. H., Michels, J., Nöthig, E.-M., and Engel, A. (2017), Bacterial Colonization and Vertical Distribution of Marine Gel Particles (TEP and CSP) in the Arctic Fram Strait, *Front. Mar. Sci.*, 4, 1–14.
- Dreshchinskii, A., and Engel, A. (2017), Seasonal variations of the sea surface microlayer at the Boknis Eck Times Series Station (Baltic Sea), *J. Plankton Res.*, 39, 943–961.
- Guerrini, F., Mazzotti, A., Boni, L., and Pistocchi, R. (1998), Bacterial–algal interactions in polysaccharide production, *Aquat. Microb. Ecol.*, 15, 247–253.
- Ortega-Retuerta, E., Reche, I., Pulido-Villena, E., Agustí, S., and Duarte, C. M. (2009), Uncoupled distributions of transparent exopolymer particles (TEP) and dissolved carbohydrates in the Southern Ocean, *Mar. Chem.*, 115, 59–65.
- Ortega-Retuerta, E., Duarte, C. M., and Reche, I. (2010), Significance of bacterial activity for the distribution and dynamics of transparent exopolymer particles in the Mediterranean Sea, *Microb. Ecol.*, 59, 808–818.
- Parinos, C., Gogou, A., Krasakopoulou, E., Lagaria, A., Giannakourou, A., Karageorgis, A. P., et al. (2017), Transparent Exopolymer Particles (TEP) in the NE Aegean Sea frontal area: Seasonal dynamics under the influence of Black Sea water, *Cont. Shelf Res.*, 149, 112–123.
- Passow, U., and Alldredge, A. L. (1994), Distribution, size and bacterial colonization of transparent exopolymer particles (TEP) in the ocean, *Mar. Ecol. Prog., Ser.*, 113, 185–198.
- Passow, U., and Alldredge, A. L. (1995). Aggregation of a diatom bloom in a mesocosm: The role of transparent exopolymer particles (TEP), *Deep. Res. Part II* 42, 99–109.

- Passow, U. (2002), Transparent Exopolymer Particles in Aquatic Environments, *Prog. Oceanogr.*, 55, 287–333.
- Porter, K. G., and Feig, Y. S. (1980), The use of DAPI for identifying aquatic microflora, *Limnol. Oceanogr.*, 25, 943–948.
- Scoullou, M., Plavšić, M., Karavoltsos, S., and Sakellari, A. (2006), Partitioning and distribution of dissolved copper, cadmium and organic matter in Mediterranean marine coastal areas: The case of a mucilage event, *Estuar. Coast. Shelf Sci.*, 67, 484–490.
- Simon, M., Grossart, H.-P., Schweitzer, B., Ploug, H. (2002), Microbial ecology of organic aggregates in aquatic ecosystems, *Aquat. Microb. Ecol.*, 28, 175–211.
- Smith, D.C., Simon M., Alldredge, A.L., Azam, F. (1992), Intense hydrolytic enzyme activity on marine aggregates and implications for rapid particle dissolution, *Nature*, 359, 139–142.
- Taylor, J. D., Cottingham, S. D., Billinge, J., and Cunliffe, M. (2014), Seasonal microbial community dynamics correlate with phytoplankton-derived polysaccharides in surface coastal waters, *ISME J.*, 8, 245–248.
- Wurl, O., Ekau, W., Landing, W. M., and Zappa, C. J. (2017), Sea surface microlayer in a changing ocean – A perspective, *Elem. Sci. Anth.*, 5, 31.

7. Eskerrak eta oharrak

Lan hau Zientzia eta Berrikuntza Ministeritzako CTM2016-75699-R (Enzimas Extracelulares y Cambio Climático en Aguas) eta Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitateko GIU17/043 proiektuen barruan burutu da. Era berean, Ainara Martínez-en laguntza eskertzen dugu.

Kukutxeztula: gaitz zaharrarentzako konponbide berrien bila

Fernandez-Martinez, Xabier¹; Amuategi, Jone¹; González-Bullón, David¹;
Belloso-Urbe, Kepa¹ eta Ostolaza, Helena¹

Biokimika eta Biologia Molekularra saila eta Biofisika Institutua (UPV/EHU, CSIC)
joneamuategi@gmail.com / xfernandez016@ikasle.ehu.eus

Laburpena

Arnasbideetako infekzioek heriotza tasa altuak eragiten dituzte munduan. Infekziorik kutsakorrenen artean dago *Bordetella pertussis* bakterio patogenoak eragindako kukutxeztula. *B. pertussis*ek jariatzen dituen birulentzia faktoreen artean arriskutsuenetako bat da Adenilato Ziklasa Toxina (ACT). Informazio asko bildu den arren, oraindik ez da zehazki deskribatu zelula ostalaria erasotzeko erabiltzen duen mekanismo molekularra. Ikerketa honetan, toxina eta mintzaren arteko elkarrekintzan lipido konposizioak daukan eragina aztertu da. Eskuratutako emaitzetatik kolesterolak toxinen aktibitatean eragin zuzena duela dela ondorioztatu da.

Hitz gakoak: *Bordetella pertussis*, adenilato ziklasa toxina, kolesterola, liposomak

Abstract

Infectious respiratory diseases are among the main death causes in humans worldwide. The bacterial pathogen Bordetella pertussis causes whooping cough, a highly contagious respiratory disease that remains an important cause of childhood morbidity and mortality. Adenylate Cyclase Toxin (ACT) is one of the important virulence factors secreted by this bacterium and has a crucial role in the early steps of colonization of the respiratory tract by the bacterium. The molecular mechanisms used by ACT to intoxicate the host cells are still poorly understood. In the present study we explored the effect of the lipid composition in the toxin interaction with lipid membranes. We conclude that ACT shows preference for the membrane cholesterol.

Keywords: Bordetella pertussis, Adenylate Cyclase Toxin, cholesterol, liposomes

1. Sarrera eta motibazioa

Osasun publikoko arazoei erreparatu gero, komunikabideek aspaldidanik izan dute birusek eragindako epidemiari garrantzia emateko joera. Gaur egungo aldzikarrietan, ebola eta dengue sukarrak dira protagonista. Hala ere, bakterio hauek ez dira mundu mailan heriotza-tasarik altuenak eragiten dituztenak. Askoren harridurarako, Osasunaren Mundu Erakundeak (OME) argitaratutakoaren arabera, azkenengo 15 urteetan heriotza tasarik altuenak eragin dituzten gaixotasunen artean kardiopatia iskemikoa, garun hodie loturiko eritasunak eta arnas bideetako infekzioak daude. Sinesten zaila izanagatik, arnasbideetako infekzioak dira gaixotasun kutsakorrik hilgarrienak¹.

Arnasbideetako infekzioen artean aski ezaguna da kukutxeztula. *Bordetella pertussis* bakterioak sortutako gaixotasuna da. Sintoma nahiko arruntak eragiten ditu: etengabeko eztul gertakariak, arnasa hartzeko zailtasuna eta sukarra, besteak beste (Kilgore *et al.*, 2016). Pertsona helduetan arrisku handirik ez duen arren, umeetan heriotza eragin dezake. Izan ere, *B. pertussis*-ek immunitate sistemako zelulak ere erasotzen ditu. Kukutxeztularen ondorioz hiltzen diren gaixoen %90a pneumonia bezalako konplikazioengatik hiltzen da.

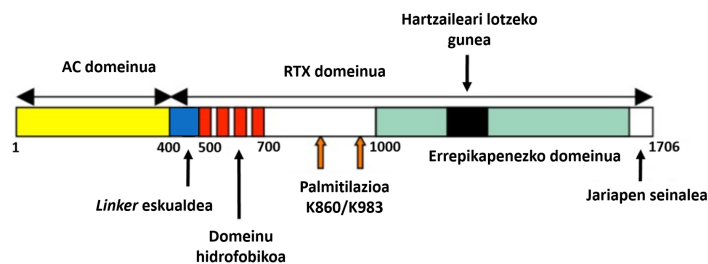
Kukutxeztularen aurkako txertoa 1940an garatu eta geroztik herrialde garatuetan gaixotasunak eragindako heriotza tasa izugarri jaitsi zen. Esaterako, AEB-etan 1980an gaixotasunaren intzidentzia 100.000 biztanleko pertsona bakoitzeko zen. Hala ere, azken hamarkadetan kasu kopurua era kezkagarrian igo da. AEBko intzidentzia kopurua 2012an 1980an baino 9 aldiz handiagoa zen. Bestalde, Brasilen kasu kopurua 2011tik 2014ra bikoiztu egin zen. Beste herrialde askok kukutxeztul kasuen igoera jasaten ari direla jakinarazi dute, esaterako, Erresuma Batuk, Australiak, Argentinak eta Kanadak (Argondizo-Correia *et al.*, 2019).

¹www.who.int

B. pertussis-ek birulentzia faktore desberdinak jariatzen ditu eta horien artean garrantzitsuenetako bat Adenilato Ziklasa toxina-hemolisina (ACT) da. Oso proteina berezia da ia edozein zelulari lotu eta bere AC domeinu katalitiko zuzenean zelula barnera sartzeko gai delako. Aipagarria da mintz plasmatikoa gurutzatzeko daukan gaitasuna, ez duelako poro baten bidez edo endozitosi bidez egiten; zuzenean mintzean zehar translokatzen da oraindik guztiz ezaguna ez den prozesu baten bidez. ACT gai da batez ere odoleko eta immunitate sistemako zenbait zelula kaltetzeko, CD18 integrina hartzaileak makrofago eta zelula dendritikoak, hain zuzen ere.

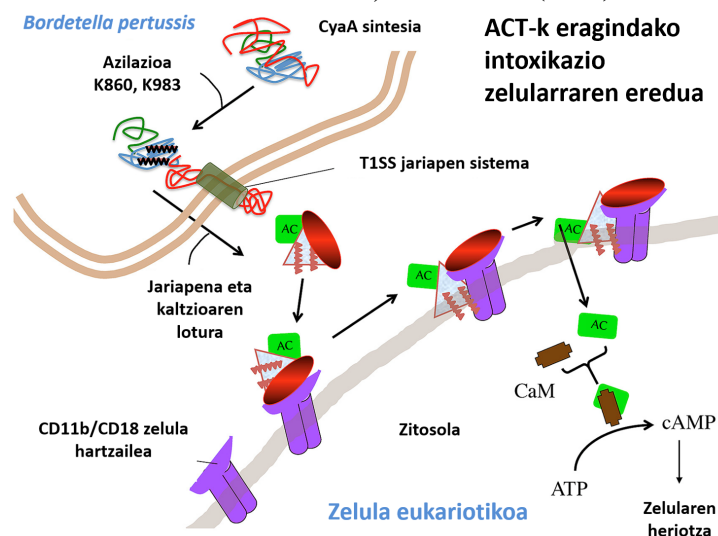
1. irudian ikus daitekeenez, egitura eta funtzioari dagokionez, ACT bi domeinu nagusik osatzen dute (Gross *et al.*, 1992). Alde batetik, AC domeinu katalitikoak zelula barnean kontrolik gabeko AMP ziklikoaren (cAMP) sintesia eragiten du, ATP kontsumituta. Honek, seinaleztapen prozesuak asaldatu eta zelularen apoptosia eragiten du. Bestalde, *Repeats in ToXins* (RTX), domeinu hemolitiko edo poro sortzaileak, mintzetan katioiekiko selektiboak diren poroak sortzeko gaitasuna du. Honela, kaltzio-sarrera azkarra eta zelula barneko potasioaren irteera eragingo ditu, ioi-homeostasia desorekatuz. Honek, zelularen lisia eragiten du (Ladant eta Ullmann, 1999). Bi domeinu hauek lotzen *Linker* eskualdea dago eta mintzekin elkarrekiteko gaitasuna duela uste da (Subrini *et al.*, 2013).

1. irudia. B. pertussisen ACT toxinarene domeinuen irudikapena (Masin *et al.*, 2015). Aminoazidoen posizioa zenbakiz adierazi da.



Hipotesi desberdinak proposatu diren arren, oraindik ez da toxinarene translokaziorako mekanismo zehatzik deskribatu. Gaur egun onartuen dagoena **2. irudian** deskribatutakoa da (O'Brien *et al.*, 2018). AC domeinuaren translokazioaren azken pausoa translokazioaren azken pausua lipid raft deituriko mintzaren mikrodomeinuetan gertatzen dela proposatu da. Eskualde hauek, besteak beste, kolesterol eta esfingomielinatan aberatsak dira. Horretaz gain, ACT toxinak A fosfolipasa aktibitate intrintsekoa duela ikusi da González-Bullón *et al.* (2017). Beraz, ACT-ak fosfolipidoen lehenengo nahiz bigarren posizioeko gantz azidoak mozteko berezko gaitasuna dauka, eta honek poroen sorrera erraztu dezakeela uste da.

2. irudia. ACT-aren domeinu katalitikoaren (AC) translokazioa azaltzen duen eredua (O'Brien *et al.*, 2018). Behin toxina jariatuta, kaltzioa lotzen zaio eta konformazio aktiboa hartzen du. AC domeinuaren aktibitateko ezinbestekoa da zelula barrura translokatzean, kalmodulina (CaM) lotzea.



2. Arloko egoera eta ikerketaren helburuak

Toxinak eragindako zیتotoxizitatearen erantzule nagusia itu-zelulen zitosomean gertatzen den cAMP-ren ekoizpea da. Gaixotasunari aurre egiteko baliabideak diseinatze aldera, ezinbestekoa da translokazioaren eredu argi eta ulergarri bat planteatzea. Horregatik, ikerketa honen helburu nagusia, AC domeinuaren translokazioa maila molekularrean hobeto ulertzea izan zen. Translokazioa zuzena izan dadin, AC domeinuaren eta zelularen mintzaren arteko elkarrekintza gertatu beharko litzateke. Elkarrekintza hau frogatzeko, esperimentu desberdinak erabili ziren. Prozesua hobeto ulertze aldera, helburu zehatzagoak planteatu ziren:

- ACT toxina basatiak, bigeruz lipidikoetara batzen denean, lortzen duen topologia eta lipido konposizio ezberdinetako mintzek topologian duten eragina aztertzea.
- ACT toxinak eragindako mintz desegonkortasunean lipido konposizioak, eta bereziki kolesterolak, duen eragina aztertzea.
- Lipido konposizioak ACT toxinarekin A fosfolipasa aktibitatean duen eragina aztertzea.
- AC domeinu isolatuak mintz ereduarekin elkarrekintzen duen aztertzea eta elkarrekintza horretan mintzen konposizioak, pH-ak eta indar ionikoak daukaten eragina aztertzea.

3. Ikerketaren muina

ACT toxinaz gain, bere AC domeinu isolatua ere aztertu da. Horretarako AC489 proteina mutantea erabili da, ACT-ren lehenengo 489 aminoazidoak dauzkana, AC domeinua eta gorago aipatutako linker sekuentzia barne. Izan ere, Karst eta kideek (Karst *et al.*, 2012) deskribatu zuten mintzekin elkarrekiteko gaitasuna zuela. Bi proteina hauek mintzekin daukaten elkarrekintza aztertzeke zelulak erabili beharrean, mintz biologikoen eredu diren liposomak erabili dira, konkretuki Large Unilamellar Vesicles (LUV) edo geruza bakarreko liposoma handiak. Tamaina uniformeak dute eta uretan solugarriak diren solutu mota desberdinak kapsulatzea baimentzen dute. Gainera, mintzaren konposizioa (lipido mota eta proportzioa) aukeratu genezake. Erabilitako liposomek hainbat fosfolipido (DOPC), esfingolipido (SM) eta kolesterol (Chol) konbinazio zituzten.

3.1. ACT eta LUVen arteko elkarrekintza

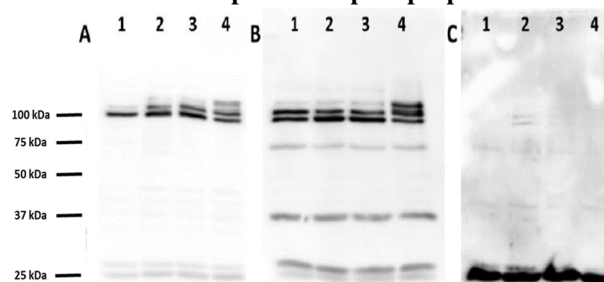
Hasteko, proteinak mintzetan txertatzean lor dezakeen konformazioari eta topologiari buruzko informazioa eskuratzeko, ACTa LUV-ekin inkubatu ostean, proteolisi esperimentuak burutu ziren tripsinarekin. Erabilitako LUV konposizioak DOPC (1), DOPC:Chol (3:1) (2), DOPC:Chol (2:1) (3), DOPC:Chol (1:1) (4) izan dira. SDS-PAGE elektroforesia eta transferentzia erdi-lehorra egin dira. Azkenik, proteinaren identifikaziorako Western Blotting teknika erabili da.

Hemen erakusten ez den arren, toxina basatia soluzioan baldintza berdinetan inkubatu zenean, peptido txikiak guztiz degradatzen zela ikusi zen. Hau proteasen mozketak puntuak eskuragarri zeudelako izan liteke. Aldiz, toxina basatia LUV-ekin inkubatzeko (**3. irudia**) pisu molekular handiagoko bandak eskuratu ziren. Izan ere, mintzak edo proteina-proteina arteko elkarrekintzek, moduren batean, toxinari babesa eskaintzen diotela uste dugu. Babes hau kolesterol portzentajea handitu ahala emendatzen zela ikusi genuen. Honen ondorioz, kolesterolak izan ditzakeen efektu desberdinen artean, mintzetan toxinarekin txertaketa eta oligomerizazioa errazten dituela ondorioztatu dugu. Honetaz gain, beste gelek alderatuz, toxina kontzentrazioarik diluituena duen gelean (**3. irudia, C atala**) toxina ia guztiz degradatzen zela ikusi genuen. Ondorioz, toxinarekin kontzentrazioa handitzeak oligomerizazioa errazten duela ere iradokitzen dugu.

Azkenik, errebelatzeko erabili genuen antigorputzaren epitopoa RTX domeinuan dagoenez, eta toxinarekin pisu molekularra 200 kDa-ekoa denez, AC domeinua mintzetik kanpo geratu dela ondorioztatu dugu. Izan ere, mintzaren babesa jaso ezean guztiz degradatzen dela esan liteke.

Esperimentu hauekin hurrengo ondorioa azpimarra dezakegu: kolesterolaren presentzia bigeruz lipidikoan ACT toxina basatiaren txertaketa edo/eta oligomerizazioa handitzen ditu, efektua kolesterol kontzentrazioarekiko proportzionala izanik. Maximoa kolesterolaren proportzioa % 50 denean (zelula eukariotoen mintzetan kolesterolak duen portzentajea) lortzen da. Bestalde, ACT toxina basatia bigeruz lipidikoan txertatzean AC domeinu katalitikoa bigeruzatik kanpo kokatzen dela iradoki daiteke, tripsinarekiko mozketak gune eskuragarriak erakutsiz. RTX domeinua, aldiz, babestuta gelditzen da. Babes hori AC domeinua proteina-proteina elkarrekintzan inplikaturik egon daitekelako lortzen dela aurrean dezakegu.

3. irudia. ACT toxinaren proteoliposomen proteolisia. Erabilitako LUV konposizioak DOPC (1), DOPC:Chol (3:1) (2), DOPC:Chol (2:1) (3), DOPC:Chol (1:1) (4) izan dira. 250 μ M LUV eta 1:250 (A), 1:1000 (B) eta 1:2500(C) izan dira erabilitako proteina:lipido proportzioak.

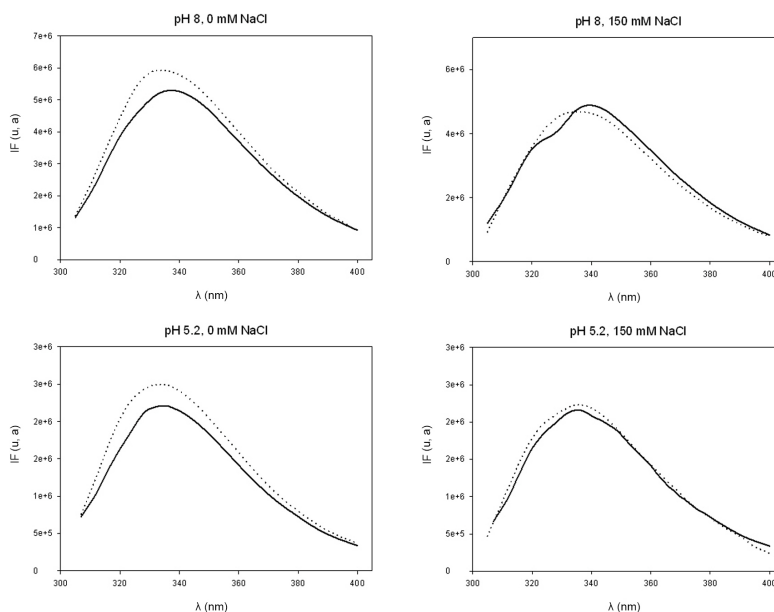


3.2. AC489 eta LUVen arteko elkarrekintza

AC489-ren kasuan, uste da mintzekin duen elkarrekintzak AC domeinuaren ondoren dagoen linker sekuentziarekin zerikusia duela. AC domeinua 1-384 aminoaziodetan dago, beraz, AC489 proteinak 100 aminoazido inguruko sekuentzia linkerra barne dauka. Sekuentzia horretan 3 triptofano daudenez (indol eraztuna duen aminoazido bat), bere fluoreszentzia propietateak aprobeztatu dira AC489 eta LUVen arteko elkarrekintza aztertzeko. Triptofanoak 295 nm-ko uhin luzeran kitzikatuz gero, fluoreszentzia emititzen dute 310-400 nm tartean. Proteinak eta mintzek elkarrekintza bat badute, triptofanoei gehiago kostatuko zaie kitzikapenean jasotako energia disipatzea. Ondorioz, fluoreszentziaren intentsitatea handiagoa izango da elkarrekintzarik egotekotan.

Beraz, triptofanoen fluoreszentzia neurtuta **4. irudian** ikus daitezkeen emaitzak lortu dira. AC489-ren fluoreszentzia neurtu da, LUV-ekin eta LUV-rik gabe, gatzdun eta gatzik gabeko disoluzioan, pH 8 eta pH 5.2-an. Lehen esan bezala, liposomen presentzia fluoreszentziaren intentsitatearen igoera bat gertatzekotan, elkarrekintza bat egon dela ondorioztatzen dugu. Beraz, AC489 mintz-ereduekin interakzionatzeko gaitasuna dauka aztertutako bi pH-etan, gatzik gabeko ingurunean dagoenean.

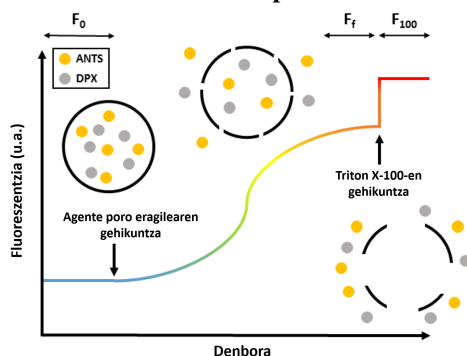
4. irudia. 250 nM AC489 kontzentrazioan, fluoreszentzia espektroen alderaketa, toxina soluzioan egonda eta toxina 100 μ M LUV-ekin inkubatuta, pH eta NaCl egoera ezberdinetan. Marra etenak LUV-ekin egindako espektroak dira eta marra zuzenak toxina bakarrik soluzioan egindako espektroak.



3.3. ACT-k eta AC489-k eragindako solutuen askapena

Kolesterolak toxinen konformazioan eta topologian duen eragina aztertu ostean, ACT-ak mintzak desegonkortzeko duen gaitasunean eraginik ote zeukan aztertu nahi izan genuen. Horretarako, solutu fluoreszenteen askapena neurtu genuen. ANTS molekula fluoreszentea eta bere amatatzailea den DPX-a konposizio desberdinetako LUV-ak erabiliz kapsulatu genituen. **5. Irudian** adierazi den bezala toxinak mintzak desegonkortuz eta solutuak askatuz gero, kanpo medioan diluitu eta fluoreszentzia emendatuko litzateke (Smolarsky *et al.*, 1977).

5. irudia. Molekula fluoreszenteen askapen saioaren irudikapen grafikoa.



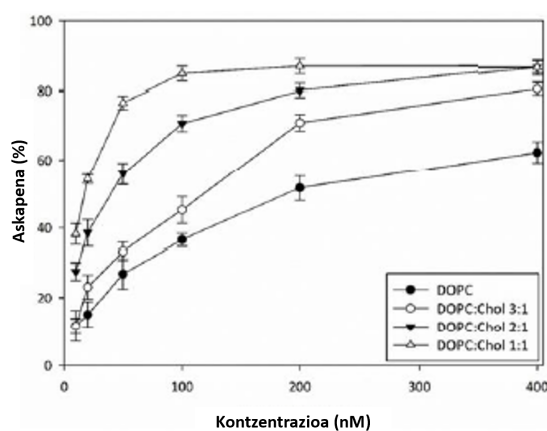
Fluoreszentzia maximoa jakiteko detergente bat gehitu dugu eta askapen portzentajeak ondorengo formularekin kalkulatu dira:

$$\text{Askapen}\% = \frac{F_f - F_0}{(F_{100} - F_0)} \cdot 100 \quad (1)$$

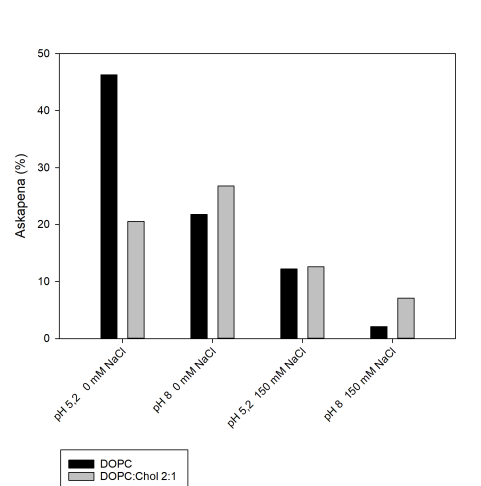
- ACT gehitu aurreko minutuaren fluoreszentzia basala (F_0).
- ACT gehitu osteko hurrengo 28 minutuen fluoreszentzia (F_f).
- Triton X-100 gehitu osteko azken minutuaren fluoreszentzia (F_f). Tritoiaren amaierako kontzentrazioa, % 0,01 [p/b] besikulak disolbatzeko nahikoa izan da.

6. irudiari erreparatuz, ACT-a erabilitako konposizio lipidikodun LUV-ak iragazkor bihurtzeko gai zela ikusi genuen, askapena nahiko azkar gertatzen zelarik. Askapen portzentajerik handienak %50-ko kolesterol portzentajearekin eskuratu genituen.

6. irudia. Lipido konposizio bakoitzerako ACT kontzentrazio desberdinekin lortutako askapen maximoak (%)



7. irudia. DOPC eta DOPC:Kolesterol (2:1 mol:mol) osatutako LUV-etan 250 nM AC489-k eragindako edukien askapen maximoa.



Besikulen edukiaren askapena eragiteko ACTren gaitasuna aztertu ondoren, kolesteroldun eta kolesterolik gabeko liposometan, AC domeinu isolatuaren (AC489) ahalmena ere aztertu da. Honetarako, ACTrekin jarraitutako prozedura berbera erabili da baina bere ordeztu AC489 proteina erabilita. **7. irudian** ikusten da kasu bakoitzean lortu zen askapen ehuneko maximoa. Aipagarria da esatea AC489-ren kasuan interesgarria zela pH-ak eta inguruneke NaCl kontzentrazioak bere gain zeukan eragina ere aztertzea.

Askapen saio hauetako emaitzak laburtzearen, ikusi dugu nola bai ACT eta bai AC489 gai diren DOPC eta DOPC:Kolesterol liposometan edukien askapen bat sortzeko. Gainera, liposometako kolesterol kontzentrazioa handitzeak, ACT proteinaren eraginkortasuna handitu du, askapen ehuneko maximo handiagoak lortuta. AC489-ren kasuan, gainera, aztertu dugu nola indar ioniko gabezia (inguruan NaCl ez dagoenean) gai den askapena eragiteko. Liposometan kolesterola dagoenean, askapen maximo apur bat txikiagoak lortu diren arren, kolesterolarek presentzia askapena askoz azkarragoa izan da kolesteroldun liposometan (3-5 aldiz azkarragoa); nahiz eta lan hau konplexuago ez bihurtzeko, irudiak ez ditugun gehitu. Hortaz, pentsa dezakegu batez ere ACT toxina afinitateren bat daukala mintzeko kolesterolarekin.

3.4. ACTaren fosfolipasa A_2 aktibitatearen neurketa

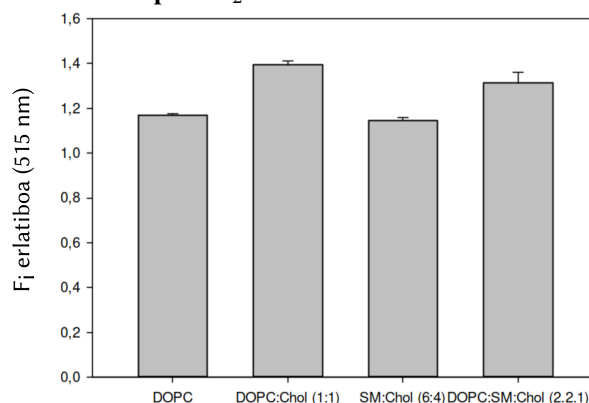
Azken urteotan, hainbat toxina bakterianok lipasa aktibitate intrintsekoak dituztela jakin da. Konkreteki, ACT toxina berezko A_1 eta A_2 fosfolipasa aktibitateak dituela ikusi da (González-Bullón *et al.*, 2017). Fosfolipasa aktibitatearen ondorioz askatzen diren lisofosfolipidoek, eta hauen kurbadura positiboak, mintz arteko flip flop mugimenduak eragiten dituztela uste da. Honek poroen sorrera erraztu eta, ondorioz, translokazioan lagundu dezakeela susmatzen dugu, aktibitate zitotoxikoa faboratuz.

Fosfolipasa aktibitatean lipido konposizioak, eta bereziki kolesterolak, izan dezakeen eragina determinatzeko, lipido konposizio desberdinetako liposomak prestatu dira, PED6 substratu fluorogenikoa gehituz. Honek bigarren gantz azidoan zunda fluoreszente bat eta buru polarrari konjugatuta dinitrofenol taldea ditu. Hauen artean quenching efektua gertatuko da. Baina, glizerolaren bigarren karbonoari lotutako gantz azidoa askatuz gero, fluoreszentzia emendio bat ikusiko genuke berriro ere.

Fluoreszentzia erlatiboa kalkulatu da, 30. minutuko espektroa (F_{max}) kontrolaren espektroarekin (F_0) zatitu da. Kontrol modura 0. minutuko fluoreszentzia espektroa, hau da, toxinarik gabekoa erabili da. **8. irudian** datuen prozesamendua egin ostean lortutako emaitzak adierazi dira.

Esfingomielina eta kolesterolez osatutako LUVetan oso aktibitate baxua detektatu genuen. Izan ere, egitura zurruna hartzen dutenez, toxina fosfolipasa aktibitatea erakusteko zailtasun handiagoak dituela uste dugu. DOPC-ak egitura fluidoa izan arren, kasu hauetan ere, nahiko aktibitate baxua detektatu genuen. Aitzitik, A_2 fosfolipasa aktibitate altuena DOPC eta kolesterolezko LUV-ekin eskuratu zen. Konposizio honetako liposomek likido ordenatu eta desordenatuaren arteko egitura hartzen dutenez, toxinarentzat errazagoa da bertan sartzea. DOPC,

8. irudia. Fosfolipasa A₂ aktibitatearen neurketa 515 nm-tan.



esfingomielina eta kolesterola konbinatzen zituzten LUV-ek, berriz, bitarteko aktibitatea erakutsi zuten. Ondorioz, toxinak likido desordenatugan edo fluidoagoan jarduteko duen gaitasuna handiagoa dela iradokitzen dugu.

4. Ondorioak

Azken aldian, gizarteak egiten dugun guztiari erabilera bat topatzeko eskatzen digu eta zientzia ez da horren salbuespen. Zientzia aplikatua edo translazionala moda-modan dagoen garaian bizi gara eta oinarritzko ikerketak bere izen ona arriskuan ikusi du. Hala ere, pentsaera hau ez da oso zuzena. Izan ere, biomedikuntzan gertatzen diren aurrerapenak ikerketa akademikoa dute oinarritzat eta gizarteak aurrera egiteko bien konbinazioa ezinbestekoa da. Hain zuzen, ACT-aren inguruko ikerketaren aurrerabideak ikuspegi berriak zabaldu ditu oinarritzko ikerkuntzan nahiz aplikatuan (Chenal, 2018). Gaur egun, antigenoa daramaten garraiatzaileak edota ACTa daramaten txertoak sintetizatzen dira. Gainera, proteinen ingeniartzan oinarrituta, ACT-aren RTX domeinua erabili da kaltzio menpeko nanotresnak garatzeko (Bulutoglu eta Banta, 2017). Aipaturikoak, biobereizketan, hidrogel katalisian, ezagutza molekularreko prozesuetan erabili daitezke.

Ikerketa honek ACTak zelula ostalarian sartzeko erabiltzen duen mekanismoa argitzen laguntzeko ekarpenak egin ditu. Bilduriko emaitzei esker badakigu ACTak kolesterol proportzio altuak dituzten mintzekiko afinitate handiagoa duela. Aldi berean, froga honek onartuen dagoen translokazio teoriarekin (**2. Irudia**) bat egiten du. Proteinak kolesterolarekiko duen afinitateak kolesterola ezagutu eta hari lotzen zaion sekuentziaren bat, gutxienez, izan dezakela iradokitzen digu.

5. Etorkizunerako planteatzen den norabidea

Proteina osoaren sekuentzia eta domeinuen funtzioa ezaguna den arren, baliteke oraindik ezezagunak diren egin-kizunak existitzea. Esaterako, beste zenbait toxintan kolesterola ezagutzen duten adostasun guneak (*Cholesterol Recognizing Aminoacid Consensus*, CRAC) aurkitu dira, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*ek jariatutako leukotoxinak, kasu (Brown *et al.*, 2013). Duela gutxi egindako *in silico* azterketetan iragarri da ACTak 8 CRAC sekuentzia posible dituela. Etorkizunera begira, sekuentzia hauek toxina eta mintzaren arteko elkarrekintzan duten garrantzia ikertu nahi da. Teorikoki posible dela ikusi dugun arren esperimentera frogatzea ezinbestekoa da. Ikerketa honetatik lortutako emaitzetatik aurreikusten dugu ACTa, leukotoxinak bezala, CRAC domeinu hauetaz baliatu daitekeela mintzarekin elkarrekiteko.

6. Erreferentziak

- Argondizo-Correia, Carolina, Ana Kelly Sousa Rodrigues, eta Cyro Alves de Brito. 2019. Neonatal immunity to bordetella pertussis infection and current prevention strategies. *Journal of Immunology Research* 2019.
- Brown, Angela C, Nataliya V Balashova, Richard M Epand, Raquel F Epand, Alvina Bragin, Scott C Kachlany, Michael J Walters, Yurong Du, Kathleen Boesze-Battaglia, eta Edward T Lally. 2013. Aggregatibacter actinomycetemcomitans leukotoxin utilizes a cholesterol recognition/amino acid consensus site for membrane association. *Journal of Biological Chemistry* 288.23607–23621.

- Bulutoglu, Beyza, eta Scott Banta. 2017. Block v rtx domain of adenylate cyclase from bordetella pertussis: A conformationally dynamic scaffold for protein engineering applications. *Toxins* 9.289.
- Chenal, Alexandre, 2018. An introduction to the toxins special issue on the adenylate cyclase toxin.
- González-Bullón, David, Kepa B Uribe, César Martín, eta Helena Ostolaza. 2017. Phospholipase a activity of adenylate cyclase toxin mediates translocation of its adenylate cyclase domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 114.E6784–E6793.
- Gross, Mary K, Douglas C Au, Arnold L Smith, eta Daniel R Storm. 1992. Targeted mutations that ablate either the adenylate cyclase or hemolysin function of the bifunctional cyaa toxin of bordetella pertussis abolish virulence. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 89.4898–4902.
- Karst, Johanna C, Robert Barker, Usha Devi, Marcus J Swann, Marilyne Davi, Stephen J Roser, Daniel Ladant, eta Alexandre Chenal. 2012. Identification of a region that assists membrane insertion and translocation of the catalytic domain of bordetella pertussis cyaa toxin. *Journal of Biological Chemistry* 287.9200–9212.
- Kilgore, Paul E, Abdulbaset M Salim, Marcus J Zervos, eta Heinz-Josef Schmitt. 2016. Pertussis: microbiology, disease, treatment, and prevention. *Clinical microbiology reviews* 29.449–486.
- Ladant, Daniel, eta Agnes Ullmann. 1999. Bordetella pertussis adenylate cyclase: a toxin with multiple talents. *Trends in microbiology* 7.172–176.
- Masin, Jiri, Radim Osicka, Ladislav Bumba, eta Peter Sebo. 2015. Bordetella adenylate cyclase toxin: a unique combination of a pore forming moiety with a cell invading adenylate cyclase enzyme. *Pathogens and disease* 73.
- O'Brien, Darragh P, Ana Cristina Sotomayor Perez, Johanna Karst, Sara E Cannella, Enguéné Véronique Yvette Ntsogo, Audrey Hessel, Dorothée Raoux-Barbot, Alexis Voegelé, Orso Subrini, Marilyne Davi, eta others. 2018. Calcium-dependent disorder-to-order transitions are central to the secretion and folding of the cyaa toxin of bordetella pertussis, the causative agent of whooping cough. *Toxicon* 149.37–44.
- Smolarsky, Moshe, Dvora Teitelbaum, Michael Sela, eta Carlos Gitler. 1977. A simple fluorescent method to determine complement-mediated liposome immune lysis. *Journal of immunological methods* 15.255–265.
- Subrini, Orso, Ana-Cristina Sotomayor-Pérez, Audrey Hessel, Johanna Spiaczka-Karst, Edithe Selwa, Nicolas Sapay, Rémi Veneziano, Jonathan Pansieri, Joel Chopineau, Daniel Ladant, eta others. 2013. Characterization of a membrane-active peptide from the bordetella pertussis cyaa toxin. *Journal of Biological Chemistry* 288.32585–32598.

7. Eskerrak eta oharrak

Artikulu hau gure gradu amaierako lanetik eratorri eta moldatu dugu. Eskerrak eman nahi dizkiogu Kepa Belloso-Uriberi eta David González-Bullóni teknika esperimental guztiak irakatsi eta ikerketak aurrera eramaten laguntzeagatik; Rocío Alonso, gure taldeko teknikariari, bere laguntzeagatik; Helena Ostolaza Etxaberi, ideia planteatu eta zuzentzeagatik; Euskal Herriko Unibertsitateari eta Biofisika Institutoari esperimentuak egiteko beharrezko baliabideak eskaintzeagatik.

Mikrofonien monitorizazio eta kontrola RF kabiteteetan

Elejaga, Ander¹; Jugo, Josu¹, Badillo, Inari¹

IZPILab, Elektrizitatea eta Elektronika saila, UPV/EHU

aelejaga001@ehu.eus

Laburpena

IZPILAB, partikula azeleragailuen ikerketa eta garapena egiten duen EHU-ko laborategia da. Bertan dagoen Maila Baxuko Irrati Maiztasun (ingelesez Low Level Radio Frequency, LLRF) sistema batean oinarrituta, irrati maiztasun (ingelesez radio frequency, RF) kabiteteetan ematen den mikrofonien ondoriozko desintonizazioaren monitorizazio eta kontrola egiteko prototipo funtzional bat garatu da. Prozesu horretan, sistemaren kabitete erresonantearen identifikazio mekanikoa egin ondoren, bi erresonantzia-modu nabarmen aurkitu dira, 305 eta 458 Hz-etan, nagusiena lehenengo hori izanda. Halaber, 305 Hz-eko modu mekanikoa kitzikatzen duen mikrofonia kontrolatzeko Adaptive Feedforward (AFF) kontrolagailu bat inplementatu da sortutako prototipoan. Modu horretan, maiztasun horretako perturbazio mekanikoak %95a txikitzea lortu da.

Hitz gakoak: Mikrofoniak, kontrol aktiboa, LLRF, IM kabitatea

Abstract

In this work a Low Level Radio frequency (LLRF) system is used as the foundation of a new functional prototype to control and monitorize the microphonic detuning of a RF cavity. For that matter, a mechanical identification of the RF cavity has been done, founding two relevant resonant modes at 305 and 458 Hz. For testing purposes, an Adaptive Feed forward (AFF) controller has been integrated on the developed prototype, achieving a 95% reduction of the 305 Hz microphonic detuning.

Keywords: Microphonics, active control, LLRF, RF cavity

1. Sarrera eta motibazioa

Partikula azeleragailuetan, kabitete erresonanteak erabiltzen dira partikulak paketatze, bideratzeko eta azeleratzeko (Humphries, 2012). Gailu horiek, kabitete eroale hutsak dira, zeinetan maiztasun jakinako uhin elektromagnetikoak (EM) injektatuz, partikula kargatuen azeleraziorako eremu EM egokiak lortzen diren. Horien funtzionamendua, erresonantzia EM fenomeno fisikoan oinarritzen da. Modu honetan, injektatzen den uhin EM-aren uhin luzeera (edo maiztasuna) kabitetearen geometriarekin bateragarria denean, horren barneko hormen aurka etengabe islatuko da eta, horrela, uhin geldikor bat sortuko du. Uhin horrek, aldi berean, partikulak azeleratzeko erabiliko diren eremu EM-ak sortuko ditu. Ondorioz, kabiteteak maiztasun jakin batzuetako uhin EM-ak bakarrik onartuko ditu (erresonantzia-maiztasunak), horren geometriaren guztiz menpekoak direnak. Gainera, gailuaren barnean sortutako eremu EM-en banaketa, kabitetea kitzikatzeko erabiltzen den erresonantzia-maiztasunaren arabera da. Erresonantzia konfigurazio horiei kabitetearen erresonantzia-moduak deritze. Horrela, gaur egungo azeleragailuetan kabitete erresonante pseudo-zilindrikoak erabiltzen dira, horien TM_{010} erresonantzia-moduak azeleraziorako eremu EM optimoak sortzen baititu. Gailu horien erresonantzia-maiztasun nominala (TM_{010} moduaren erresonantzia-maiztasuna) kabitetearen diseinuaren arabera da, baina beti irrati maiztasun (Radio frequency ingelesez, RF) tartean aurkitzen da, 3Hz-etik 300GHz-era.

Azeleragailu bat lanean dagoenean, haren RF kabiteteek jasan ditzakete hainbat iturrik sortutako perturbazio mekanikoak: huts ponpek sortutako bibrazioak, hozte sistemen helio likidoan sortzen diren burbuilen ondoriozko bibrazioak, etab. (Powers, 2015). Maiztasun baxuko perturbazio mekaniko horiei mikrofoniak deritze. Gaur egungo kabitete supereroaleek 10^9 ordenako kalitate faktorea izan dezakete (Padamsee, 2009) eta beraz, haien funtzionamendu banda zabalera oso estua da. Hori dela eta, aipatutako perturbazio mekanikoek kabitetearen geometrian sortutako deformazioen ondorioz, gailuaren erresonantzia-maiztasuna aldatu egiten da. Injektatutako RF

seinalearen maiztasuna mantendu egiten denez, honek sortutako erresonantzia ez da optimoa izango eta azelerazio eremuek gradiente txikiagoa izango dute, baita kabitreak kontsumo energetiko handiagoa ere.

Fenomeno hori zuzendu ahal izateko, azeleragailuetan mikrofoniak kontrolatzeko sistema espezifikoak erabiliz beharrezkoa suertatzen da. Horien garapen prozesuan zehar eta, azeleragailu errealean inplementatu baino lehen, derrigorrezkoa da simulazio eta froga etapa bat, non kontrolagailuaren funtzionamendu egokia aztertzen den sistema isolatu batean. Gaur egun, etapa hauek Hardware-In-the-Loop sistemak erabiliz betetzen dira, horrek dakartzan mugekin. Lan honen helburu nagusia, prototipo funtzional bat garatzea da. Hortan, RF kabitare erreal bat erabiliz, hainbat kontrol algoritmoen funtzionamendua aztertzeko aukera egongo da.

2. Arloko egoera eta ikerketaren helburuak

Mikrofonien kontrolari dagokionez, bi planteamendu orokor erabiltzen dira gaur egungo partikula azeleragailuetan: kontrol pasiboa eta kontrol aktiboa.

Alde batetik, kontrol pasiboa kabitare erresonanteen egitura aztertzean datza, berorren puntu ahulak titaniozko eratzun zurruneekin indartzeko (Posen eta Liepe, 2011)(Liepe, 2015).

Bestetik, kontrol aktiboa dago. Sistema horietan, hainbat eragingailu mekaniko erabiliz, kabitarearen geometria modu kontrolatu batean eraldatzen da mikrofoniek sortutako deformazioei kontra egiteko.

Mota horietako kontrol sistemetan bi algoritmo mota erabiltzen dira nagusiki, kontrol moldagarriak (Kandil *et al.*, 2005; Scheinker *et al.*, 2014) eta perturbazioen kontrol aktiboa (Neumann *et al.*, 2010; Vincent *et al.*, 2011; Geng, 2017; Rybaniec *et al.*, 2016); biak feedforward kontrol-akzio batean oinarritzen dira. Alde batetik, kontrol moldagarriekin mikrofonien ondoriozko desintonizazioa 7,4-ko faktore baten txikitzea lortu da (31 Hz-etik 4,2 Hz-etara) (Kandil *et al.*, 2005). Aldiz, perturbazioen kontrol aktiboa erabiliz, 7-ko faktore baten txikitu dira aipatutako mikrofoniak.

Teknika horien zailtasun nagusia eragile mekaniko egokien aukeraketan datza. Izan ere, erantzun ez-lineala dute, baita histeresi zikloa ere (Berek *et al.*, 2015). Gaur egun, bi eragile mota desberdin erabiltzen dira; pausoz-pausoko motorrak eta piezoelektrikoak. Azkeneko horiek emaitza hoberenak lortu dituzte.

Gainera, sistema horiek ezin daitezke azeleragailu errealean gainez zuzenki garatu, baizik eta sistema isolatuak (test-bench-ak) behar dira, non kontrol sistemaren eta kontrol algoritmoen funtzionamendua bermatu ahal den. Froga horiek egiteko, kabitare erresonante supereroale isolatuak behar dira, baina horien erabilgarritasun-egoera oso murriztua denez (gehienak azeleradoreetan inplementatuta daude), sistema aktiboaren garapen prozesua asko trabatzen da.

Modu honetan, lan honen helburu nagusia da RF kabitare batek jasandako mikrofonien ondoriozko desintonizazioa monitorizatzeko eta kontrolatzeko aukera emango duen prototipo funtzional bat diseinatzea eta garatzea. Halaber, perturbazio mekaniko horien eta kabitareak sumatutako desintonizazioaren arteko erlazioa aztertzeko baliagarria izango da. Modu horretan, prototipoa bukatuta dagoenean Adaptive Feedforward (AFF) kontrol algoritmo bat inplementatuko da bertan mikrofonien ondoriozko desintonizazioa kontrolatzeko eta prototipoaren baliagarritasuna bermatzeko.

3. Mikrofonien monitorizazio eta kontrolerako prototipoaren diseinu eta garapena

Aurretik aipatu den bezala, lan honetan garatutako prototipoa EHU-ko partikula azeleragailuen laborategian (IZPI-LAB) dagoen LLRF sistema (Badillo, 2015) batean oinarritzen da. Sistema horren zeregin nagusia RF kabitarean injeztatzen den seinalearen anplitude eta fasea kontrolatzea da, gailuaren barnean azelerazio eremu egokia sortu ahal izateko.

LLRF sistemetan ohikoa den bezala, sistema horretan ere RF seinalea I eta Q osagaietan demodulatu egiten da, gero horiek kontrolatu ahal izateko. Osagaia horien bitartez, RF seinalearen fase eta anplitudearen informazioa era erabilgarriago batean lortu daiteke, izan ere, RF seinalearen maiztasuna konstantea den bitartean, I/Q osagaiak konstanteak izango baitira (2 eta 3 ekuazioak).

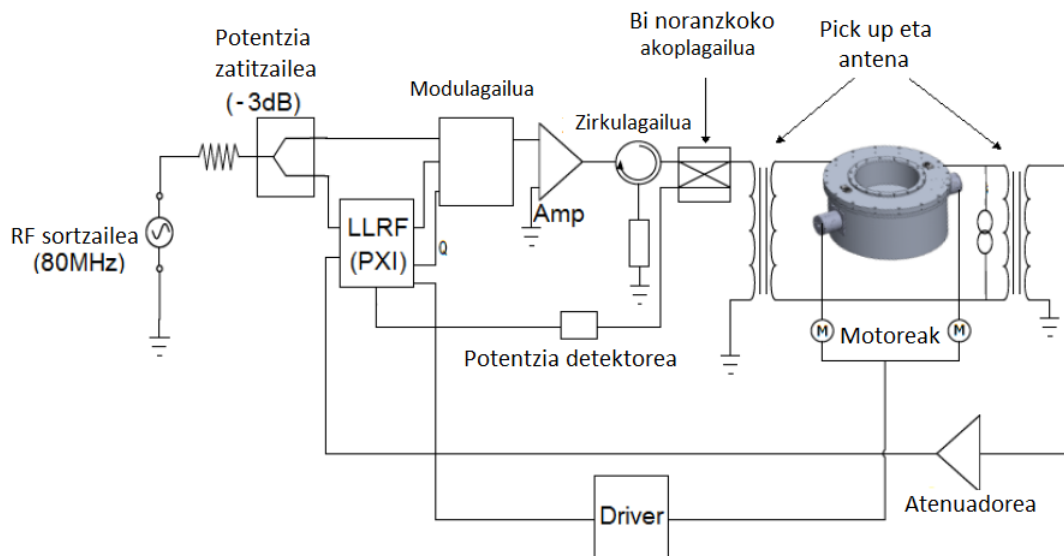
$$x(t) = A \sin(\omega t + \varphi) \quad (1)$$

$$I = A\cos(\varphi) \quad (2)$$

$$Q = A\sin(\varphi) \quad (3)$$

Inplementazioari dagokionez eta 1 irudian ikusi daitekeen bezala, LLRF hibridoa da. Alde batetik, RF seinalea analogikoki demodulatzen da eta bestetik, I eta Q osagaiak kontrolatzen dituen algoritmoa FPGA (Field-programmable gate array) batean inplementatuta dago, PXI (PCI extension for instrumentation) teknologia erabiliz.

1. irudia. LLRF sistemaren egitura



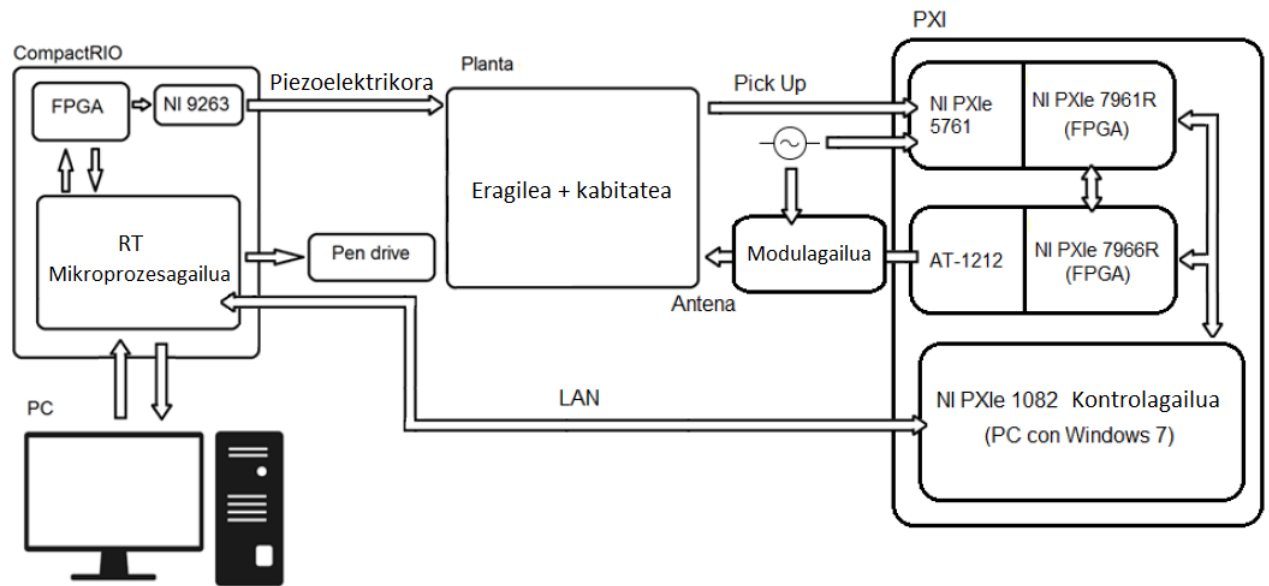
LLRF sistema honek, Injektatutako RF seinalearen fase eta anplitudea kontrolatzeko, 50MS/s-ko laginketa maiztasuna (subsampling (Mishali eta Eldar, 2011)) duen kontrol begizta bat dauka. Begizta horretan, kabitatearen barnean dagoen RF eremua neurtu eta demodulatu ondoren, I/Q osagaietan banatu egiten da. Gero, osagai horiei PI kontrol bat aplikatzen zaie, kabitatearen eremuak konstante mantentzeko kapaza izango den kontrol seinale bat sortzeko. Azkenik, kontrol seinale hori erabilita, 80MHz-eko RF seinale bat modulatu egiten da kabitatean injektatu baino lehen.

Bestalde, LLRF sistemak beste kontrol begizta motelago bat dauka desintonizazio estatikoak zuzentzeko. Horrek, bi motor direla medio, kabitatearen barruan bi enbolo sartu eta atera egiten ditu bere geometria eraldatzeko eta, modu horretan, desintonizazio estatikoa zuzendu ahal izateko.

Lanean zehar, LLRF sistema horretan mikrofonikak kontrolatzeko beste kontrol begizta berri bat inplementatu da. Horrek, RF seinalearen I eta Q osagaien modulazioan berriro oinarrituz, eta eragile piezoelektriko baten bidez, mikrofonien ondoriozko desintonizazioak kontrolatzeko gaitasuna du. Eragile mota horiek heltzen zaizen kontrol seinalearen proportzionala den deformazio mekanikoa sortzen dute, mikrometroko zehaztasunez. Aipatu beharra dago, mikrofonien ondoriozko desintonizazioak, I eta Q osagaietan perturbazioak sortzen dituela (fase eta anplitude modulazio moduan).

Kontrol horretaz aparte, LLRF sistemak kabitateak jasaten dituen bibrazio mekanikoak neurtu eta monitorizatu ahal ditu, azelerometro bat dela medio. Modu horretan, sistema berri horrek RF eremuen desintonizazioa eta bibrazio mekanikoen arteko erlazioa aztertzei aukera bideratzen du. Inplementazioari dagokionez, PXI eta compactRIO teknologiak erabili dira. 2 irudian ikusi daiteke inplementazio honen deskribapen orokorra.

2. irudia. Kontrol sistemaren implementazioa



4. RF kabitarearen identifikazio eta ereduztapen matematikoa

Mikrofonien kontrola diseinatzeko, lehenik eta behin kabitarearen identifikazio mekanikoa egin da, horren erresonantzia-modu mekanikoak bilatzeko. Kabitareak jasandako deformazioa erresonantzia modu horietan maximoa denez, mikrofonien efektua ere maximoa izango da bertan. Ondoren, mikrofoniek RF eremuen gainean duten efektua aztertu eta matematikoki ereduztatu da.

4.1. Mikrofonien aurrean RF kabitareak duen erantzun mekanikoaren azterketa

Esperimentu honen helburua kabitarearen erresonantzia-modu mekanikoen kokapena aurkitzea da. Izan ere, maiztasun horietan kabitareak sentikorrakoa izango da perturbazio mekanikoen aurrean. Hau lortzeko, sistemaren eragile piezoelektrikoa erabiliz, kabitareak maiztasun aldakorra duen uhin mekaniko baten bidez kitzikatu da, gero bere erantzun mekanikoa (hormen bibrazioa) neurtzeko.

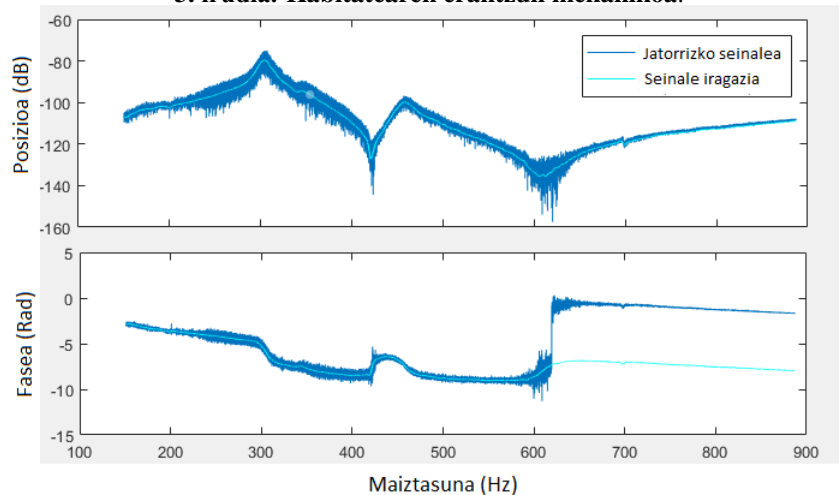
Kitzikapen seinaleari dagokionez, sistemaren modu dinamikoa guztiak kitzikatzeko bezain beste harmonikoa izan behar ditu. Kasu honetan, 100-900Hz-eko maiztasun tartea aztertuko denez, (bertan ematen direlako normalean mikrofoniek) maiztasun tarte horietan harmonikoa ugari dituen seinalea behar da. Gainera, seinalearen energia gehiena maiztasun horietan egotea komenigarria da. Guzti hori kontuan izanda, erabilitako seinalea chirp lineala (Ek. 4) izan da: sinu seinale bat zeinen maiztasuna linealki aldatzen den denboraren menpean.

$$u(t) = A \sin\left(\omega_0 t + \frac{\omega_f - \omega_0}{2T} t^2\right) \quad (4)$$

A seinalearen anplitudea, ω_0 seinalearen hasierako maiztasun angeluarra, ω_f seinalearen bukaerako maiztasun angeluarra eta, azkenik, T seinalearen iraupena izanda. Horrela bada, esperimentuan erabilitako kitzikapenerako chirp-ak 30 segundoko iraupena, 8V-eko anplitudea eta 100-1000Hz-eko maiztasun tartea du. Esperimentua egin ondoren, lortutako kabitarearen erantzun mekanikoa, maiztasun eremuan, 3 irudian erakusten dena da.

Ikusi daitekeenez, kabitareak bi erresonantzia-modu mekaniko ditu 305 Hz eta 458 Hz-etan, lehenengoa nagusia izanik (20 dB gehiago). Modu horietan, kabitarearen egiturak deformazio maximoak jasango ditu 305 Hz-eko frekuentzia duen perturbazio mekaniko baten bidez kitzikatzen denean eta, ondorioz, desintonizazioa maximoa izango da kasu horietan. Aipatu beharra dago, fasearen grafikan jatorrizko seinaleak duen saltoa, datuen

3. irudia. Kabitatearen erantzun mekanikoa.

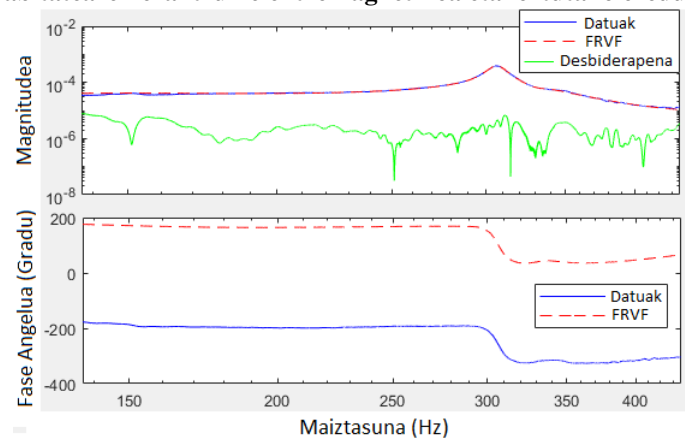


prozesaketan ematen den *wrapping* efektu baten ondoriozkoa dela (hau da, 2π radianeko desfase bat agertzen da).

4.2. Mikrofoniek kabitatearen RF eremuetan duten efektuaren azterketa

Behin kabitatearen erantzun mekanikoa ezagutzen dela, hurrengo esperimentu honetan mikrofonien efektua RF eremuen gainean (desintonizazioa) aztertu da. Horretarako, aurreko ataleko prozedura errepikatu da, baina kasu honetan, LLRF sistema erabiliz, RF eremuen I eta Q osagaiak neurtu dira (hormen bibrazioen ordeztu). Aipatu beharra dago, bi osagai horiek koadraturan daudenez, RF eremuen desintonizazioari buruzko informazio bera dutela. Beraz, nahikoa da horietako bakar bat aztertzea, kasu honetan, I osagaia. Kabitatearen erantzun elektromagnetikoa matematikoki ereduatzeko vector fitting algoritmoa erabili da. Horren bitartez, kabitatearen RF eremuek perturbazio mekanikoen aurrean duten portaera aurreratu duen eredu matematikoa lortu da, zeinean kontrol algoritmoak simulazioan probatu daitezkeen. Aipatu beharra dago, 500 Hz-etik aurrera, mikrofonien efektua, zarata EM-ren mailakoa dela. Beraz, bertatik aurrerako bibrazioak arbuigarriak direla ondorioztatu da.

4. irudia. Kabitatearen erantzun elektromagnetikoa eta lortutako eredu matematikoa.

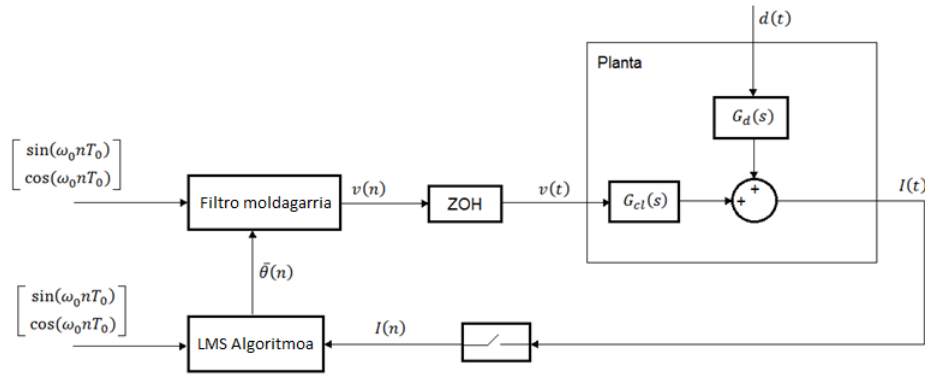


Ikusi daitekeenez, kabitateak erresonantzia-modu mekaniko nagusia duen maiztasunean (305 Hz), mikrofonien efektua oso nabarmena da. Horrek, erresonantzia-modu mekanikoen eta kabitatearen desintonizazioaren arteko erlazioa egiaztatzen du. Izan ere, desintonizazioa kabitatearen geometriaren aldaketaren ondorioz sortzen da eta, lehen aipatu den bezala, deformazio hori maximoa da kabitatearen erresonantzia-modu mekaniko bat kitzikatzen denean. Horretaz aparte, eredu matematikoaren portaera (FRVF kurba) kabitatearen portaeraren oso antzekoa dela ere nabarmendu daiteke. Aipatu beharra dago, bigarren grafikoan eredu matematikoaren eta sistema errealearen faseen arteko desberdintasuna 360 gradukoa dela, beraz, fase berdinak dira.

5. Mikrofonien kontrolaren garapen eta inplementazioa

Mikrofonien kontrola egiteko, Adaptive Feedforward kontrol algoritmoa hautatu da. Kontrolagailu horren bidez, mikrofonien anplitude eta frekuentzia berdina, baina alderantzizko fasea duen uhin mekanikoa aplikatuko zaio kabitareari. Modu honetan, mikrofonia eta kontrol-uhinen arteko interferentzia suntsitzailea gertatuko da eta, ondorioz, mikrofonien efektua gutxituko da.

5. Irudia: AFF kontrolaren egitura



Lehenik eta behin, algoritmo hori maiztasun bakarreko mikrofoniak kontrolatzeko gai dela aipatu beharra da. Bere funtzionamendua hurrengokoa da: Alde batetik, filtro moldagarri batek, koadraturan dauden eta mikrofonien maiztasun berdina duten bi sinusoide anplitudez aldatu eta batu egiten ditu, kontrol seinalea sortzeko. Paraleloki, LMS algoritmo batek kabitarearen irteera (I osagaia) minimoa bilakatzeko, filtroak izan behar dituen parametroak kalkulatzeko momentu oro. (Shi *et al.*, 2004) lanean azaltzen den prozesua jarraituz, hurrengokoak dira inplementatu beharreko ekuazioak (filtroaren anplitudeak).

$$A_1(n) = A_1(n-1) + \gamma I(n) \sin(\omega_0 n T_0) \quad (5)$$

$$A_2(n) = A_2(n-1) + \gamma I(n) \cos(\omega_0 n T_0) \quad (6)$$

$A_{1,2}$ filtro moldagarriaren parametroak, ω_0 mikrofonien maiztasuna, $I(n)$ RF eremuen I osagaia eta γ kontrol parametro bat izanik.

Lehenengo, algoritmoaren funtzionamendua simulazioan frogatu da, 4.2 atalean lortutako eredu matematikoa eta Simulink programa erabiliz. Bertan, kontrolagailuaren errendimendua hainbat kasutan aztertu da eta hau ondorioztatu da: Alde batetik, $I(n)$ irteera seinalearen atzerapenarekin esperimendu da, algoritmoaren sendotasuna berretsiz, izan ere, 0.1 segundoko atzerapena baino gehiagorekin ere mikrofoniak deuseztatzeke gai da. Bestalde, mikrofonia eta kontrol seinaleen maiztasunen arteko aldea minimoa izan behar duela ikusi da (0,3 Hz-eko desberdintasunarekin, errendimendua asko murrizten da).

Azkenik, algoritmoa LLRF sistemaren NI 7966R moduluko FPGA-n inplementatu da. Horren funtzionamendua frogatzeko, 305 Hz-eko perturbazio konstante bat aplikatu zaio kabitareari, eta AFF kontrola aktibatu ostean, mikrofonien ondoriozko desintonizazioa %95a murrizten dela ikusi da.

6. Ondorioak

Mikrofoniak kontrolatzeko sistemak inplementatu baino lehen, beharrezkoa da horien funtzionamendua prototipoetan azterzea. Lan honetan, horrelako sistema baten garapenerako prozesua diseinatu eta probatu egin da, baita emaitza egokiak lortu ere.

Prototipoaren garapenean zehar, RF kabitarearen erresonantzia-modu mekanikoen garrantzia frogatu da mikrofoniaren ondoriozko desintonizazioan. Izan ere, mikrofonía batek kabitarearen erresonantzia-modu mekaniko bat kitzikatzeko beharrezkoa den maiztasuna baldin badu, perturbazio mekaniko horrek kabitarearen geometrian sortutako deformazioak nabarmenak izango dira eta bere eragina barneko RF eremuetan handia izango da.

Beste alde batetik, AFF kontrol algoritmoaren sendotasuna frogatu da maiztasun bakarreko mikrofonía kontrolatzeko. Halere, azeleragailu modernoetan ematen diren mikrofonía gehienak (eta arazo gehien sortzen dituztenak), kriostatoan dagoen helio likidoan sortzen diren burbuilen ondoriozkoak dira. Mikrofonía mota horiek maiztasun espektrorik anitza dute eta, beraz, horien kontrola egiteko beste algoritmo batzuk erabili behar dira. Aipatu beharra dago, behin prototipoa garatuta dagoela, algoritmoak inplementatzea eta probatzea oso erreza dela; izan ere, sistemaren FPGA-n kontrola inplementatzea nahikoa da.

7. Etorkizunerako planteatzen den norabidea

Lortutako prototipoari dagokionez, hurrengo pausoa da hainbat algoritmoen errendimendua frogatzea. Adibidez, maiztasun bat baino gehiagoko mikrofonía kontrolatzeko, AFF algoritmo batzuen inplementazio paraleloa aztertea interesgarria izan daiteke. Bestalde, eragingailu berrien errendimendua frogatzea ere egokia da.

Epe luzera, hemen landutako prozesua jarraituz, prototipo berri bat garatzea interesgarria izango litzateke, kabitare supereroaleekin eta horiei dagozkien eragile piezoelektrikoak erabiliz. Horrela, gaur egungo azeleragailuetan ematen diren egoerak fidelki erreproduzitu ahalko lirateke eta kontrolagailuak frogatzeko aukera ezin hobea izango litzateke.

8. Erreferentziak

- Badillo, I., 2015. *Advanced Techniques for Diagnostic and Control Applied to Particle Accelerators*.
- Berek, T., K. Cook, eta Y. Vannoy. 2015. General narrowband noise cancellation development at the aps. In *First Microphonics Workshop*.
- Geng, Z. 2017. Superconducting cavity control and model identification based on active disturbance rejection control. *IEEE Transactions on Nuclear Science*.
- Humphries, S. 2012. *Principles of Charged Particle Acceleration*, volume 1. Dover Publications, 2 edition.
- Kandil, T. H., H. K. Khalil, J. Vincent, T. L. Grimm, W. Hartung, J. Popielarski, R. C. York, eta S. Seshagiri. 2005. Adaptive feedforward cancellation of sinusoidal disturbances in superconducting rf cavities. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research A*.
- Liepe, M. 2015. Microphonic experience at cornell- a collection of results. In *First Microphonics Workshop*, volume 12, 283–290.
- Mishali, M., eta Y. C. Eldar. 2011. Sub-nyquist sampling. *IEEE Signal Processing Magazine*.
- Neumann, A., W. Anders, O. Kugeler, eta J. Knobloch. 2010. Analysis and active compensation of microphonics in continuous wave narrow-bandwidth superconducting cavities. *Physical Review Special Topics*.
- Padamsee, H. 2009. *RF Superconductivity: Science, Technology, and applications*. Verlag GmbH & Co. kGaA.
- Posen, S., eta M. Liepe. 2011. Minimizing microphonics detuning by optimization of the stiffening rings. In *Proceedings of SRF*.
- Powers, T., 2015. Microphonics.
- Rybaniec, R., K. Przygoda, V. Ayvazyan, J. Branlard, Ł. Butkowski, W. Cichalewski, S. Pfeiffer, C. Schmidt, H. Schlarb, eta J. Sekutowicz. 2016. Fpga based rf and piezo controllers for srf cavities in cw mode. In *IEEE-NPSS Real Time Conference (RT)*.
- Scheinker, A., S. Baily, D. Young, J. S. Kolski, eta M. Prokop. 2014. In-hardware demonstration of model-independent adaptive tuning of noisy systems with arbitrary phase drift. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research A*.
- Shi, J., R. Zmood, eta L. Qin. 2004. Synchronous disturbance attenuation in magnetic bearing systems using adaptive compensating signals. *Control Engineering Practice*.
- Vincent, J., D. Morris, N. Usher, Z. Gao, S. Zhao, A. Nicoletti, eta Q. Zheng. 2011. On active disturbance rejection based control design for superconducting rf cavities. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research A*.

Onddo harizpitsuen garapenaren erregulazioan parte hartzen duten transkripzio faktoreen dinamika zelularra

Otamendi, Ainara¹; Perez-de-Nanclares-Arregi, Elixabet¹; Oiartzabal, Elixabet¹; Cortese, Marc S.¹; Espeso, Eduardo A.²; Etxebeste, Oier^{1*}

¹Biochemistry II laboratory, Department of Applied Chemistry, Faculty of Chemistry, University of The Basque Country, 20018 San Sebastian.

²Department of Cellular and Molecular Biology, Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC), Ramiro de Maeztu 9, 28040 Madrid.

E-mail: otamendiainara@gmail.com

Laburpena

Hainbat zelula mota hazkuntza polarizatuaren bidez hazten dira, besteak beste neurona, polen-hodi eta harizpi itxurako onddoen hifak. Zelula horiek noranzko bakar batean asimetriki hazten dira, luzatzen ari diren hodien itxuraz. Zelulen hazkuntza gunea kanpo inguruarekin kontaktu zuzenean dago, eta estimulu bat jasotzean informazio hori nukleora iritsi eta beharrezko erantzuna emateko transdukzio mekanismo konplexuak garatu behar izan dituzte zelula mota horiek. Izan ere, polarizazioaren ondorioz, zelula hazi ahala hazkuntza gunea eta nukleoen arteko distantziak areagotzen doaz. Ondorengo lerroetan, harizpi itxurako *Aspergillus nidulans* onddoan era honetako transdukzio lanetan diharduen FlbB transkripzio faktorearen dinamika aztertuko da, espora asexualen ekoizpena erregulatzen duena.

Hitz gakoak: Harizpi itxurako onddoa, hazkuntza polarizatua, garapen asexuala, transkripzio erregulatuak, transdukzio mekanismoak.

Abstract

*Multiple cell types, such as neurons, pollen tubes and hyphae of filamentous fungi grow by polarized extension as elongated tubes. The cell growth region, or polarity site, receives external information in the form of different stimuli. However, nuclei are the cellular compartment where the response to those stimuli must be triggered. Permanent polarization causes an increase in the distance between polarity sites and nuclei, making the transduction of signals difficult. Therefore, polarized cells have developed sophisticated transduction mechanisms to overcome it. In this work, we will analyze the polarity site-to-nucleus dynamics of the transcription factor FlbB in fungus *Aspergillus nidulans*. This regulator controls developmental transitions and the production of asexual spores.*

Key words: filamentous fungus, polarized growth, asexual development, transcription regulators, transduction mechanisms.

1. Sarrera eta motibazioa

Espezie ororen bizirautea bermatuko bada, bizi den ingurunera egokitu beharra du. Ingurugiroko aldaketetara hobekien moldatzeko gaitasuna duten espezieek aurrera begira ebolutiboki jarraipen aukera gehiago izango dute. Moldagarritasun eta egokitzapen hau bermatzeko hainbat mekanismo desberdin garatu dira.

Izaki bizidunen historian zelulaniztasunaren agerpena mugarri izan da. Zelulaniztasun sistema konplexuak antolaketa biologiko maila gorenaren eredia direla esan ohi da, zelulen arteko komunikazio eredu berriak garatu behar izan direlarik. Hain zuzen, eboluzioan 5 momentutan soilik agertu da zelulaniztasun konplexua, eta horietako bat onddoetan (Nagy et al, 2018). Antolaketa konplexuen agerpenak zelulen arteko elkarkidetzaren erroka berriak ekarri baditu ere, ingurura egokitzeko eta hedatzeko abantailak ere eskaini dizkie organismo horiei.

Harizpi itxurako onddoen espezie batzuk gai dira inguruko estimulu jakinen aurrean beren patroia genetikoa aldatu eta konidioforo deritzen egitura asexual zelulanitzak garatzeko. Onddoak, ingurura nahiz habitat berrietara zabaltzeko baldintza egokiak direla antzematean, ordura arte polarizazioz luzeka hazten joan diren zelulek, hifa izenez ezagunak, hazkuntza eten eta ugalketa asexualari leku emango diote (Adams et al., 1998). Bertan, eratuko diren konidioforo egitura tridimentsional konplexutatik, milioika espora asexual (konidia izenekoak) ekoitziko dira. Espora horiek dira, hain zuzen, onddoaren infekzio eta nitxo berrietara hedatzeko mekanismo nagusia (Ugalde et al., 2014). Esporen erretzeak norbanako berrien hazkuntzari emango dio hasiera, onddoaren bizi zikloa berrabiaraziz.

Inguruko baldintzen aurrean harizpi itxurako onddoek erakusten duten egokitzapen eta patroia genetikoaren birmoldaketa gaitasuna onddoaren hedatze eta infekzio azkartasunaren gako dira. Onddo horien artean hainbat espezie patogeno aurki ditzakegu. Landare ugariren patogeno izaki, munduko labore uzta ugariren hondatzea eragiten dute. Urtero, onddoen eraginez, 500 milioi pertsona baino gehiagoren elikagai beharrak asetzeko adina jaki galtzen dela kalkulatu da (Fisher et al., 2012). Bestalde, pertsonen osasuna ere arriskuan jartzeko gai dira, heriotza bera ere ekar dezaketelarik. Txanponaren beste aldean baina, beste zenbait espezie industrialki baliatzen dira intereseko hainbat produkturen ekoizpenerako (azido organikoak, antibiotikoak, etabar). Osasun eta ekonomia interesek onddo harizpitsuen biologiararen ikerketa bultzatu dute.

Jakintza biologikoaren mugak hedatzeko nahiak berak ere harizpi itxurako onddoak jomugan jarri ditu oinarritzko ikerketaren mailan. Izan ere, organismo hauen zelula karakteristikoak diren hifak, neurona eta polen-hodien antzera, polarizazioz hazten dira; hau da zelulak noranzko bakarrean hazten dira. Historikoki, *Aspergillus nidulans* harizpi itxurako onddoa hazkuntza polarizatua eta garapen prozesuak aztertzeko tresna baliagarria bilakatu da, besteak beste laborategi eskalan manipulatzeko erraza baita, eta gertuko beste espezie batzuk ez bezala ez da patogenoa.

2. Arloko egoera eta ikerketaren helburuak

Harizpi itxurako onddoen bereizgarri nagusietako bat zelulen hazkuntza polarra da. Zelula, polarizazio puntu batetik abiatuz hodi bat balitz bezala hazten da, polarizazio edo hazkuntza gune hori hodiaren muturrean mantentzen delarik. Onddoen kasuan egitura luzexka hauei hifa deritze eta elikagaien bila hazten dihardute ingurugiroko baldintzek aurkakorik eragin ezean.

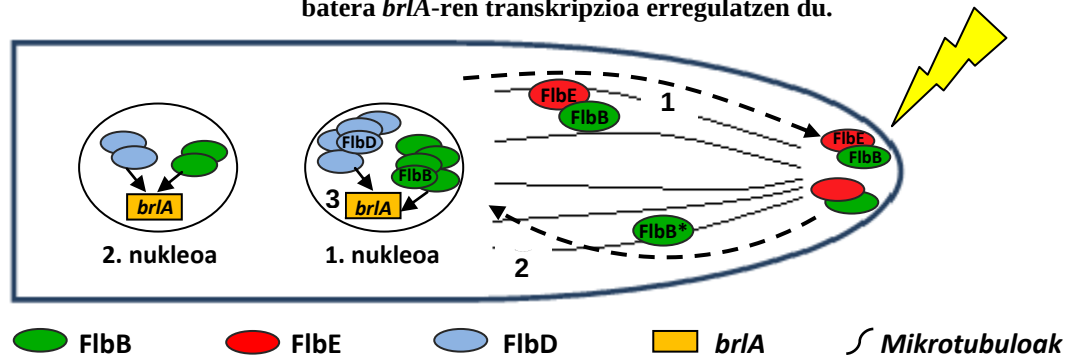
Hifen hazkuntza lekua (punta izenez ezagutzen dena) da substratu berria kolonizatzen lehena, eta ondorioz, kolonizatza doan sustratoari buruzko informazioa jasotzen duen lehena. Aldiz, jasotako estimuluaren aurrean onddoak beharrezko transkripzio erantzuna emateko informazioak nukleora iritsi behar du. Beraz, puntaren eta nukleoen (*A. nidulans*en kasuan, hifak egitura nukleoanitzak dira) arteko komunikazioa ezinbestekoa eta etengabekoa izango dela pentsa daiteke. Baina polarizazioak berak, hifaren punta, prozesu biologikoen kontrola eta garapen aginduak ematen diren gunetik, nukleotik alegia, urrunago egotea eragiten du. Orokorrean, hazkuntza polarizatua duten zelulek bi gune horien aldentzeak eragiten dituen mugei aurre egiteko seinaleen transdukzio mekanismo konplexuak garatu dituzte, distantzia erlatiboki luzeak abiadura azkarrean gainditzeko gai direnak. Neuronetan, transkripzio faktore (TF: geneen adierazpena erregulatzen duten proteinak) ugarik dihardu era honetako distantzia luzeko komunikazio lanetan. Neuronen adibideari jarraiki, hazkuntza eremutik informazioa nukleora zuzenean garraiatzen duten TF-ak ere badaude onddo harizpitsuetan, nukleoa kanpo seinaleei erantzun egokia eman ahal izateko dagokien geneen adierazpena erregulatuko dutelarik.

Onddoetan seinale jakinek (airearekiko hifen kontaktuak, zenbait estres motek, etabar) ugalketa asexuala, eta ondorioz, esporen sintesia eragiten dute. *A. nidulans*-en kasuan, konidioforo izena dute ekoizten diren egitura asexualek eta bakoitza 10000 espora asexual izatera iritsi daiteke. Horretarako, aipatutako estimulu horiei dagokien “aginduek” nukleora iritsi behar dute eta *A. nidulans* bezalako onddoetan, nukleoa *brlA* genearen transkripzioa aktibatu behar da (Adams et al., 1998). Ugalketa asexuala kontrolatzen duten geneak bi bide

genetikotan taldeka daitezke. Bigarrena konidioforoa osatuko duten zelula mota gehienaren sintesia kontrolatzen duen gene taldea da, CDP (*central developmental pathway*) akronimoarekin ezagutzen dena. Bidezidor honen lehen genea da, hain zuzen, *brlA*, eta konidiazioari hasiera emango bazaio gene honen aktibazioa ezinbestekoa da; fase asexualaren mugarrria dela esan liteke, beraz.

Lehen bide genetikoan, aipatutako seinaleei erantzunaz, *brlA*-ren transkripzioa aktibatu ala ez erabakitzen duten geneak taldekatzen dira. UDA (upstream developmental activation) akronimoa erabiltzen da bide genetiko hau izendatzeko. Bertan kokatzen da FlbB TF-a, *A. nidulans*-en hifen puntan aurkitzen dela ezagutzen den lehen TF-a (Etchebeste et al., 2008).

1. irudia. Hifa zelula polarizatu baten eta FlbB TF-aren dinamikaren irudikapena. 1) FlbB/FlbE konplexuaren garraio akropetala hazkuntza lekurtz. 2) Kanpo seinaleren bati erantzunez, FlbB-ren garraio basipetala nukleoetara. 3) FlbBk, nukleora iristean, FlbD izeneko bigarren TF batekin batera *brlA*-ren transkripzioa erregulatzen du.



Edozein proteinak, lan honetan aztertutakoak barne, zelula barnean duen lokalizazioa eta dinamika aztertzeko proteina horiek epitopo jakin batez etiketatzen dira. Epitopo edo etiketa horren ezaugarri nagusia fluoreszentzia emititzea da, honela, fluoreszentzia mikroskopia baten laguntzaz, etiketatutako proteina zelula barruan non kokatzen den ikus daiteke. FlbB-ren kasuan, mikroskopiaz behatzean bi lokalizazio nagusi ikus daitezke. Batetik, eta kontutan hartuta TF bat izanda geneen adierazpena kontrolatu behar duela, hifen nukleoetan pilatzen da. Baina, hazkuntza lekutik gertuen dauden nukleoetan detekta daiteke bakarrik, puntatik urrundu ahala fluoreszentzia nuklearraren intentsitatea ahultzen doalarik (Etchebeste et al., 2008). Bestetik, hifen hazkuntza lekuan, puntan, ere pilatzen dela ikusi da. Lokalizazio bikoitz honek FlbBk seinaleen transdukzioan izan zezakeen rola sakonago aztertzea eraman zuen gure ikerketa taldea. Besteak beste, *flbB* genea genomatik ezabatzean ($\Delta flbB$ andua), proteina hori ekoizteko ezintasunak ondokoaren konidiazioa, esporen produkzioa, inhibitzen du. Onddoak kotoi itxura hartzen du, *fluffy* fenotipo bezala ezagutzen dena.

Hifen hazkuntzan zehar FlbB puntan aurkituko bada ezinbestekoa du FlbE deritzon UDA bide genetikoko proteina baten esku-hartzea (ikus 1go irudia). Proteina honen gabeziak FlbB-ren deslokalizazioa dakar puntatik eta, aldi berean, ondokoaren konidiatzeko ezintasuna. Are gehiago, aurreko lanetan frogatu da FlbE bidezko FlbB-ren kontzentrazioa puntan ezinbestekoa dela gerora nukleoan *brlA* aktibatzeke eta esporen sintesia eragiteke (Herrero-García et al., 2015).

FlbB puntan dela, ezezaguna den arrazoi edo estimuluren baten eraginez, puntatik askatu eta nukleorako bidea egiten du seinalearen berri ematera. Bertan TF gisa *brlA*-ren adierazpena erregulatzen du. Alabaina, nukleoan pilatzeko FlbD deritzon (Garzia et al., 2010) bigarren TF baten bitartekaritza beharrezkoa da (ikus 1. irudia).

Beraz, FlbB-ren erregulatzaile aktibitatea zelula barneko bere lokalizazio eta dinamikaren menpe dago. Eta aldi berean, FlbB-ren dinamika, FlbE eta FlbD-k, eta ziurrenik beste proteina batzuek kontrolatzen dute. Lan honen helburua FlbB-ren dinamikak seinaleen transdukzio mekanismoan eta garapenaren kontrolean jotzen duen rola argitzen laguntzea da. Horretarako, *A. nidulans* ondokoan modu estandarrean erabiltzen diren biologia molekularreko hainbat teknika

(proteinen etiketatzea, gene jakinen ezabatze edo delezioa, edo mutazio puntualak txertatzea, esaterako) erabili da.

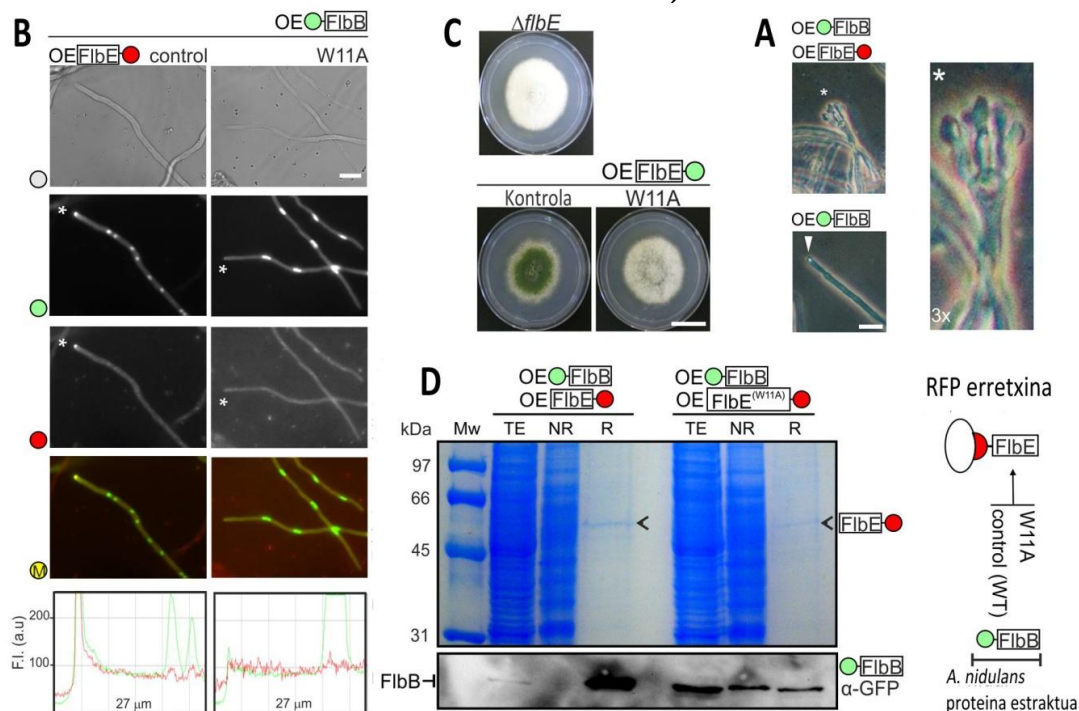
3. Ikerketaren muina

3.1 FlbB-ren garraio akropetala (puntaranzko garraioa eta lokalizazioa)

Aurrez iada egindako ikerketek FlbB eta FlbE arteko harreman funtzional estua iragartzen zuten (Garzia et al. 2009). Adibidez, *flbE* genea genomatik ezabatzean (FlbE proteina ez da sintetizatzen), FlbB ez zen puntara ailegatzeko eta, ondorioz, esporen sintesia inhibitu egiten zen (Garzia et al., 2009). Kontrako aldean, FlbE proteinaren kontzentrazioa areagotzearen (gainadierazpena) FlbB-ren puntako kontzentrazioa ere handitzen zen, kultibo baldintza espezifikotik esporen asexualen sintesia eraginez (ikus 2A irudia; Otamendi et al., ebaluazioan). Beraz, FlbB-k hifen puntan duen kokapena FlbE-ren kontzentrazioarekin zuzenki lotuta dago.

2. irudia. A) *gpdA*(gainadierazpena)::FlbE::RFP; *gpdA*::GFP::FlbB anduiaren fluoreszentzia mikroskopio irudiak, FlbE/B-ren lokalizazio subzellularra ikus daiteke kontrol eta FlbE(W11A) fondo mutatuan.

Fondo mutatuan FlbB (GFP epitopo berdeaz) eta FlbE-ren (RFP epitopo gorriaz) fluoreszentzia apikalak galdu egiten dira. Eskala barra= 10µm B) $\Delta flbE$, WT (andui basatia) eta *gpdA*::FlbE(W11A) anduiaren fenotipoa medio solidoan. Eskala barra= 5µm C) *gpdA*::FlbE::RFP; *gpdA*::GFP::FlbB anduiaren fenotipoa 26 orduz medio likidoan hazten egonda. Konidioforoen goiztiarren eraketa ikus daiteke eskubiko irudian. Eskala barra= 2cm. D) Pull-down esperimentuak *gpdA*::FlbE::mRFP edo *gpdA*::FlbE(W11A)::mRFP proteinak amu gisa erabilia. Forma mutantearen kasuan, GFP::FlbBren immunodetekzioa nabarmenki txikitzen da R frakzioan (TE:erauzkin totala; NR: eluitutako frakzioa; R:erretenitutako frakzioa).



Bi proteinen arteko hartu-emana hobeto ulertu nahian FlbE-ren parte hartzea ikertu nahi izan da. Azterketa bioinformatiko desberdinak erabiliz, FlbE proteinaren sekuentziaren barruan eremu desberdinak daudela ikusi da. Eremu horietako bakoitzak FlbB eta FlbE-ren puntako lokalizaziorako duen garrantzia aztertzeo, banan banan mutatu egin ziren. Eta sortutako andui mutante bakoitzaren fenotipoa eta bi proteinen lokalizazio subzellularra aztertu ziren (ikus 2. irudia, B eta C atalak). Lokalizazioa aztertzeo fluoreszentzia mikroskopioa erabili zen beste behin, horretarako bi proteinak epitopo banaz etiketatu ziren; FlbB GFP-rekin (irudian berdez adierazia) etiketatu zen eta FlbE, berriz RFP-z (gorri koloreaz irudian). Eremu zehatzetako

aminoazidoak mutatzek onddoaren konidiazioa kaltetzen du, ia kasu guztietan, FlbB/E puntatik desagertu izanaren ondorioz. Honek guztiak FlbE-ren zenbait eremuk prozesu hauetan duten garrantzia uzten du agerian.

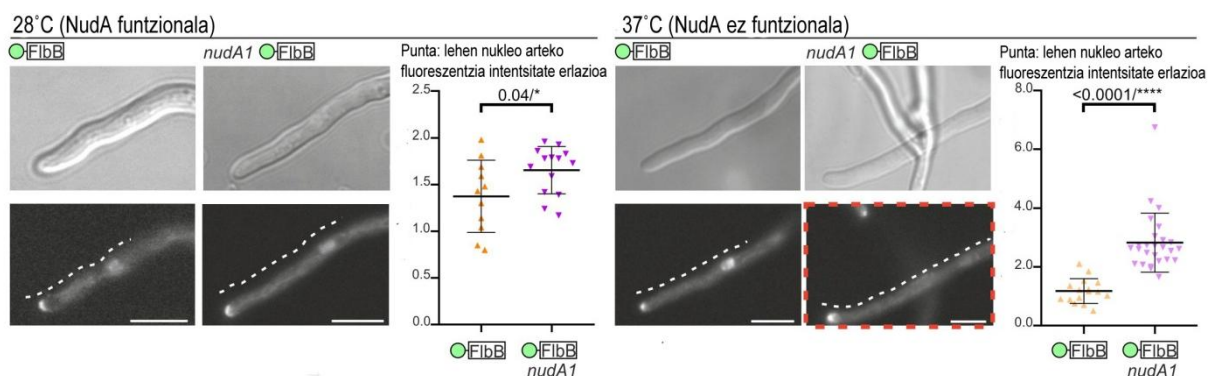
Aztertutako FlbE-ren eremuen artean azpimagarrietako bat E1 eremua dugu, FlbE-ren lehen 33 aminoazidoek osatzen dutena. Zenbait plataforma bioinformatikok proteina batek izan ditzakeen funtzioak proposatzen dituzte, aminoazido sekuentzien irakurketaz. FlbE-ren kasuan funtzio predikzioek E1 eremuan seinale peptido bat egon litekeela aurrezaten dute. Seinale peptidoa daramaten proteinak, orokorrean, erretikulu endoplasmatikora bideratu ohi dira (eta handik gehienetan Golgiren aparatura). FlbE-ren E1 eremuko mutantea (W11A) akonidiala zen, FlbE/Bren puntako lokalizazioaren galaren ondorioz (ikus 2. irudian B eta C).

FlbE-ren zenbait aldaera mutanteek FlbB-ren puntako lokalizazioaren galera eragiten dutenez, TF-k puntarako bidea FlbE-rekin elkarturik egiten duela pentsa liteke. Horrek bi proteinen arteko interakzioa ekarriko luke, ziurrenik. Ustezko elkarrekintza hori frogatu nahian proteina-proteina immunoprezipitazio saiakuntza burutu ziren. *Pull-down* esperimentu hauek, aztertu nahi den proteina amu gisa erabilia, erretenituta geratu diren proteinen azterketa ahalbidetzen dute. Gure kasuan FlbE-ri tiraka, honek FlbB heltzeko gaitasuna duela frogatu zen, erretenitutako frakzioan FlbB detektatu ahal izan baita. Gainera, ikusi zen FlbE-ren E1 eremua ezinbestekoa dela interakzio horretan; izan ere, E1 eremuaren W11A mutazioaz elkarrekintza nabarmenki ahuldu egiten zen (ikus 2D irudia). Baina, sortutako beste andui mutante batzuen analisiak erakusten du, beharrezko izanagatik, E1 eremua ez dela nahikoa FlbB-ren puntako lokalizazioa bermatzeko, eta beste eremu batzuk ere ezinbesteko direla (Otamendi et al., ebaluazioan).

3.2. FlbB –ren garraio basipetala (punta-nukleo garraioa)

Behin FlbB puntan dela kanpo baldintzak egokiak direnean FlbB atzera bueltan nukleoranzko bidea abiatzen du zitoplasman zehar. Zelula barruan mikrotubuluek (MT), harizpi itxurako egitura proteikoek, hainbat elementu subzelularren garraioan dihardute. Hori horrela MT-en parte hartzearen aukera esku artean, MT-etan zehar garraio lanetan diharduen dineina proteina motoreak FlbB-ren garraioan izan zezakeen rola aztertzea erabaki zen. Izan ere, dineinak tren bagoi funtzioa du nolabait esateko, MT-ak trenbideko erraiak izaki, horiei segika “bidaiariak” garraiatzen ditu MT-en hasierarantz. Lan honetarako dineina proteinaren osagai den NudA oinarri hartuta (Xiang X. et al, 1994), *nudA1* mutazio termo-sentikorra duen andui FlbB-ren lokalizazioa aztertu zen. Mutazio termo-sentikorra dela esaten da tenperaturaren baitan NudA funtzionala (28 °C) edo ez-funtzionala (37° C) izango baita andui mutante honetan.

3. irudia. GFP::FlbB-ren lokalizazio subzelularra *nudA1* mutazio termo-sentikorra duen andui mutantean. (Ezker aldean) 28°C-tan, temperatura permisiboa izaki, NudA funtzionala da eta FlbB puntan nahiz nukleoan ikus daiteke. (Esku aldean) 37°C-tan, temperatura errestriktiboan alegia, FlbB puntan kokatzen jarraitzen du baina, nukleoan jada ez da begiztatzen.



28°C-tan oraindik, temperatura permisiboa izaki (NudA1 funtzionala da), bai erreferentzia andui baina mutatuan ere ikus daiteke FlbB nukleoan. Aldiz, 37°C-tara igotzean temperatura errestriktibora ailegatuko ginatke, non *nudA1* mutazioaren eraginpean aurkitzen da onddoa eta

FlbB ez da nukleoetan pilatzen (ikus 3. irudia). Beraz puntatik nukleorako FlbB-ren garraioa inhibitu du NudA proteinaren inaktibazioak. Honek pentsatzera garamatza dineina proteina motorea beharrezkoa dela FlbB-ren garraio basipetalean. Dineinaren parte hartzea eta aurre lanetan deskribatutako MT-en beharra bat datoz aurkeztutako nukleoranzko garraio ereduarekin.

3.3. FlbB-ren akumulazio nuklearra eta transkripzio funtzioa

Esan bezala, kanpo seinaleen aurrean onddoak eman beharreko erantzuna nukleoan gorpuzten da, beharrezko geneen adierazpena erregulatuz. Kasurako FlbB-k estimulu ezezagunek bultzatuta *brlA*-ren transkripzioa erregulatzen du konidiazioa ahalbidetzeko. Baina transkripzio funtzioa bete dezan FlbB-k nukleora sartu behar du. Horretarako baina, ezinbestekoa du cMyb motako bigarren TF baten, FlbD-ren (Garzia et al., 2010), aktibitatea. Bestalde, FlbD bera ere TF denez, *brlA*-ren transkripzioaren erregulazioan hartzen du parte (Wieser et al., 1995). FlbD proteina sintetizatzeke gai ez den andui batean, $\Delta flbD$ anduia, alegia, FlbB ez da nukleoan pilatzeko gai eta zitoplasman geratzen da aurrera eta atzera mugitzen, nora joanik ez balu bezala (Otamendi et al., ebaluazioan). FlbB nukleora iristen ez denez, onddoak ez du esporarik ekoizten.

FlbD proteinaren parte-hartzea hobeto ulertu nahian, zelula barruan duen lokalizazioa eta proteina beraren adierazpena aztertu nahi izan ziren. Horretarako, HA_{3x} nahiz GFP epitopoez FlbD etiketatzen saiatu izan gara. Baina HA_{3x}-az etiketatzean proteinaren ertz bat nahiz bestea, C- terminala edo N-terminala, onddoaren konidiazio gaitasuna partzialki kaltetzen da (ikus 4 irudia). Aldiz, eta bitxia dirudien arren, GFP etiketaz (HA_{3x} etiketa baino 9 aldiz luzeago dena) ez da horrelakorik gertatzen.

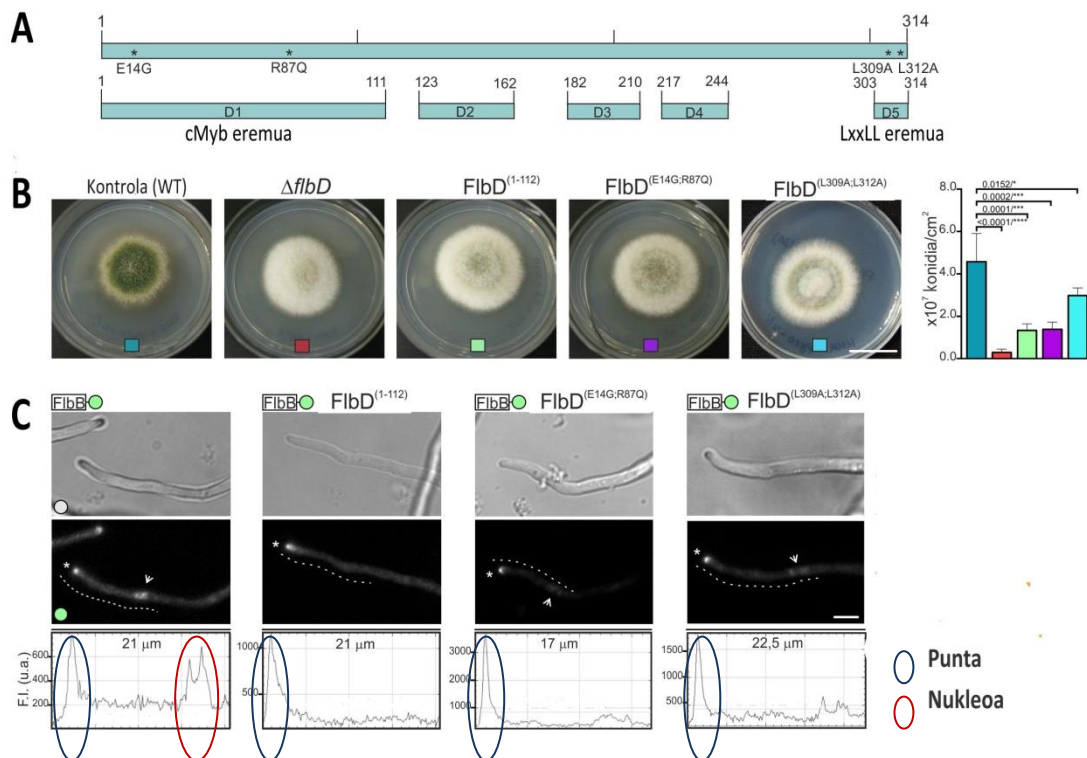
Proteinen etiketatzeak sarritan arazoak ekar ditzake, proteina beraren funtzioa oztopatu baitezake. Izan ere, proteinak bere ez duen “motxila” bat lotu zaio gainean eta gehiegizko “zama” ekar liezaioke. Gure kasua izan zitekeelakoan, FlbD proteinaren eremuen azterketa bioinformatikoari ekin zitzaion. Analisi informatiko hauek hurbileko espezieetan FlbD proteinaren baliokideak izan daitezkeenak, ortologoak, bilatzen dituzte eta *A nidulans* beraren FlbD-ren sekuentziarekin alderatzen dituzte. Aminoazido sekuentzien konparaketa honetan eremuren bat espezie desberdinetan asko errepikatzen bada eremu hori oso kontserbatuta dagoela esan ohi da. Domeinu kontserbatuenek sarritan funtzio jakin bati erantzuten diote, eta horregatik ebolutiboki kontserbatzen joan dira espezie batetik bestera. FlbD-ren azterketak hainbat eremu kontserbatu hauteman ditu, baina bereziki bi eremu nabarmentzen dira kontserbazio altuagatik (ikus 4. irudia A). Hain justu, proteinaren bi muturretan aurkitzen dira eremu horiek. N-terminalean cMyb (DNA-ri lotzeko domeinua) dago eta C-terminalean aminoazido sekuentzia labur (LxxLL) bat. Analisi bioinformatikoekin jarraituz, hauek C-terminaleko sekuentzia labur horrek errezeptore nuklearrekin lotzeko gaitasuna eman dezakeela proposatzen dute.

FlbD-ren bi ertzetako domeinuak proteinaren funtzionalitatean izan dezaketen eginkizuna aztertze aldera, eremu horietan mutazioak eragin ziren. cMyb eremuari dagokionez, bi andui sortu ziren. Batek, FlbD(1-112) forma trunkatua, cMyb eremuari soilik dagokion proteina zatia, adierazten du. Besteak, FlbD(E14G,R87Q) cMyb eremuan mutante puntuala den forma adierazten du. Bestalde, C-terminaleko LxxLL sekuentzia ere mutatu zen, FlbD(L309A; L312A) forma sortuz. Mutante orotan, erreferentziazko andui basatiarekin alderatuz, konidia produkzioa nabarmen txikiagoa da (ikus 4. irudia B), eta FlbB-ren lokalizazio nuklearra ere kaltetu egin da, fluoreszentzia intentsitatea modu esanguratsuan jaisten delarik eremu horretan (ikus 4. irudia C). Ondorioz, esan genezake cMyb nahiz ustezko LxxLL eremuek eginkizun garrantzitsua betetzen dutela FlbB-ren kokapen nuklearrean.

Bi muturreko eremuen garrantziak azal lezake, beraz, FlbD HA_{3x}-az etiketatzean anduiaren konidiazio gaitasuna txikiagotzea, proteinaren funtzionalitatea kaltetzen ari baita. Honek, baina, ez luke argituko zergatik GFP etiketarekin ez dugun halako efekturik antzematen. Baliteke GFP etiketarekin, HA_{3x} bera baino handiagoa izaki, FlbD::GFP proteina ezegonkorra izatea eta proteinaren degradazioa gertatzea.

Hipotesi hori baieztatu edo ezeztatzeko HA_{3x}::FlbD::GFP etiketa bikoitzadun FlbD-ren forma adierazten duen anduia sortu zen. Proteina erauzkin totaletatik HA_{3x} etiketa daramaten proteinak detektatzen dira immunodetekzioz, hauen gutxi gorabeherako tamaina ere jakin daitekeelarik. Kasu honetan bi banda bereizten ziren. Alde batetik, konstrukzio osoari zegokiona (HA_{3x}::FlbD::GFP), eta bigarrena HA_{3x}::FlbD-k edukiko lukeen tamainari zegokiona. Beraz, badirudi neurri batean GFP-ren degradazioa gertatzen dela, GFP-z etiketatzeak anduiaren fenotipoan aldaketarik zergatik ematen ez den azalduz.

4. irudia. A) FlbD proteinaren eremu analisia. Bost eremu (D1,D2,D3,D4 eta D5) ortologoetan oso kontserbatuta daude, baina bereziki D1 eta D5. Azken bi eremu horien azterketarako egindako aminoazido aldaketak ere azaltzen dira. B) Andui basatia (WT), $\Delta flbD$, FlbD(E14G,R87Q), FlbD(1-112) eta FlbD(L309A; L312A) formak adierazten dituzten anduiaren fenotipoa medio solidoan. Andui mutanteek konidia ekoizpen txikiagoa aurkeztzen dute. Eskala barra = 2 cm. C) FlbB::GFP-ren kokapen subzelularra WT, FlbD(E14G,R87Q), FlbD(1-112) eta FlbD(L309A; L312A) anduietan. Erreferentziazko anduiarekin alderatuta andui mutanteetan FlbB-ren fluoreszentzia nuklearra jaitsi egin da. Eskala barra = 5 μ m.



4. Ondorioak

FlbB-ren garraio akropetalari dagokionez, puntarako bidean, FlbE-ren zenbait eremu ezinbestekoak dira. Eremu horien artean E1 eremua dago, azterketa bioinformatikoei seinala peptido bezala identifikatzen dutena. E1 eremu hori ezinbestekoa da baina aldi berean ez da nahikoa FlbBren garraio akropetala eman dadin (beste eremu batzuk ere behar dira). Puntan kokatu ostean, seinalen transdukzioa burutu ahal izateko, FlbB-k MT-gaineko dineina motore molekularren bidezko garraioa behar du nukleora iristeko. Azkenik, FlbB nukleoan mantentzeko beharrezko du FlbD-ren parte-hartzea. Honetarako, FlbD-ren bi ertzetako eremuak, cMyb (amino ertza) eta LxxLL (karboxilo ertza), beharrezkoak dira.

5. Etorkizunerako planteatzen den norabidea

FlbB-ren dinamikarako beharrezko diren partaide guztiak oraindik ere ezagutzen ez ditugunez, horien identifikazio eta ezaugarritzea izango da etorkizuneko helburuetako bat. FlbB-k hifen puntarantzko bidean FlbE-ren presentzia ezinbestekoa du, FlbE-FlbB konplexua

osatzuz. Baina, FlbE-z gain, elementu ezezagun gehiagoren parte-hartzea beharrezko izan liteke. FlbE-ren E1 eremuko ustezko peptido seinaleak besikula bidezko garraio posible bat proposatzera garamatza ER-Golgi sistematik barrena. FlbB/E konplexuaren interaktore posibleen identifikazioak garraio horretan beharrezko liratekeen proteinak ezagutu eta ezaugarritzeko aukera emango liguke.

Nukleora bueltako garraioa dineinaz eta MT-z ematen dela iradoki da. Baina, FlbB dineina-bidezko garraio mekanismora nola lotzen den edo zein bitartekarik hartzen duen parte oraindik erantzuteko dago. Garraio basipetalaren azken urrats gisa badakigu FlbD beharrezkoa dela FlbB nukleoratzeko eta *brlA*-ren transkripzioari ekiteko, baina oraindik ez dakigu FlbD-ren jarduna FlbB-kiko zehazki zein den. Bien arteko harreman funtzional zehatza argitzeke dago. Bi aukera mahairatu izan dira; batetik, lehen urrats batean FlbD-k FlbB nukleora sartzea bideratuko luke eta gerora lotuko lirateke bi proteinak *brlA*-ren sustatzailera (*pbrlA*) gene honen adierazpena erregulatuz. Proposatzen den bigarren aukeran, lehenik FlbD lotuko litzateke esandako sustatzailera, ondoren FlbBren lotura ahalbidetuz.

Dinamikaz haratago, interesgarria litzateke bestalde kanpo seinaleen aurrean FlbBk nola diharduen ulertzea. Izan ere, FlbB puntan dagoela kanpo estimulu bat da ziurrenik puntatik askarazi eta nukleoranzko bidean jartzen duena. Alabaina, oraindik ezezaguna zaigu zein den seinalea, eta nola gauzatzen den seinale hori maila molekularrean, zein aldaketa eragiten den FlbB-rengan (edo FlbE-rengan). Puntan jazotzen diren aldaketek ahalbidetzen dute FlbB-ren transkripzio faktore gisa jarduteko forma aktiboa. Seinale honen izaera eta mekanismoak ezagutzeak ugalketa asexulerako “jauzia” nola ematen den ulertzen lagunduko liguke. Eta etorkizun batean, harizpi itxurako onddoen dispersio mekanismo nagusi den konidia esporen produkzioa kontrolatzeko tresnak garatzen lagun liezaguke.

6. Erreferentziak

- Adams T. H., Wieser J. K., Yu J. H. (1998): “Asexual Sporulation in *Aspergillus nidulans*”, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62, 35-54.
- Etchebeste O., Ni M., Garzia A., et al. (2008): “Basic-zipper-type transcription factor FlbB controls asexual development in *Aspergillus nidulans*”, *Eukaryotic Cell*, 7, 38-48.
- Etchebeste O., Herrero-García E., Araújo-Bazán L., et al. (2009): “The bZIP-type transcription factor FlbB regulates distinct morphogenetic stages of colony formation in *Aspergillus nidulans*”, *Molecular Microbiology*, 73, 775-789.
- Fisher M.C., Henk D.A., Briggs C.J., Brownstein J.S., Madoff L.C., McCraw S.L., Gurr S.J. (2012): “Emerging fungal threats to animal, plant and ecosystem health”, *Nature*, 484, 186-194.
- Garzia A., Etchebeste O., Herrero-García E., et al. (2009): “*Aspergillus nidulans* FlbE is an upstream developmental activator of conidiation functionally associated with the putative transcription factor FlbB”, *Molecular Microbiology*, 71, 172-184.
- Garzia A., Etchebeste O., Herrero-García E., et al. (2010): “The concerted action of bZip and cMyb transcription factors FlbB and FlbD induces *brlA* expression and asexual development in *Aspergillus nidulans*”, *Molecular Microbiology*, 75, 1314-1324.
- Herrero-García E., Perez-de-Nanclares-Arregi E., Cortese M.S., et al (2015): “Tip-to-nucleus migration dynamics of the asexual development regulator FlbB in vegetative cells” *Molecular Microbiology*, 98, 607-24.
- Nagy L., Kovács G. eta Krizsán K. (2018): “Complex multicellularity in fungi: evolutionary convergence, single origin, or both?”, *Biological Reviews*, 93, 1778-1794.
- Otamendi A., Perez-de-Nanclares-Arregi E., Oiarzabal E., et al (2018): “Developmental regulators FlbE/D orchestrate the polarity site-to-nucleus dynamics of the fungal bZIP transcription factor FlbB” *bioRxiv*(preprint), DOI: 10.1101/467563.
- Ugalde U., Rodríguez-Urra A. (2014): “The Mycelium Blueprint: insights into the cues that shape the filamentous fungal colony”, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98, 8809-8819.
- Wieser J., Adams T.H. (1995): “*flbD* encodes a Myb-like DNA-binding protein that coordinates initiation of *Aspergillus nidulans* conidiophore development” *Genes Development*, 9, 491-502.
- Xiang X., Beckwith S.M., Morris N.R. (1994): “Cytoplasmic dynein is involved in nuclear migration in *Aspergillus nidulans*”, *Proc Natl Acad Sci*, 91, 2100-2104.

Aktibitate antiproliferatiboa duten konposatu heterozikliko fosforodunen prestaketa: I topoisomerasaren inhibitzaile berrien diseinua, sintesia eta ebaluazio biologikoa

Selas, Asier; Alonso, Concepción; Rubiales, Gloria eta Palacios, Francisco

Kimika Organikoa I saila, Farmazia Fakultatea eta Lascaray Ikerketa Zentroa (Lascaray Research Center), Euskal Herriko Unibertsitatea (UPV/EHU)

asier.selas@ehu.eus

Laburpena

Lan honetan aktibitate antiproliferatiboa duten TopI-aren inhibitzaile berrien sintesia eta ebaluazio biologikoa aurkezten da. Fosforodun kinolina deribatuen hainbat konposatu serie diseinatu dira eta Povarov erreakzio multikonponentearen bitartez eraginkorki sintetizatuak izan dira. Prestatutako konposatu berriek oro har TopI-arekiko inhibizio balio onak aurkeztu dituzte, baita aktibitate antiproliferatibo esanguratsua hainbat minbizi-lerro zelularretan.

Hitz gakoak: I Topoisomerasa , Kinolina, Fosforoa, Antiproliferatiboa.

Abstract

In this work we report the synthesis and biological evaluation of candidates for novel TopI inhibitors with antiproliferative activity. Some series of phosphorus containing quinoline derivatives were rationally designed and efficiently synthesized by the multicomponent Povarov reaction. Most of the newly prepared compounds have shown a promising TopI inhibitory values and a good antiproliferative activity against different cancerous cell lines.

Keywords: Topoisomerase I, Quinoline, Phosphorus, Antiproliferative.

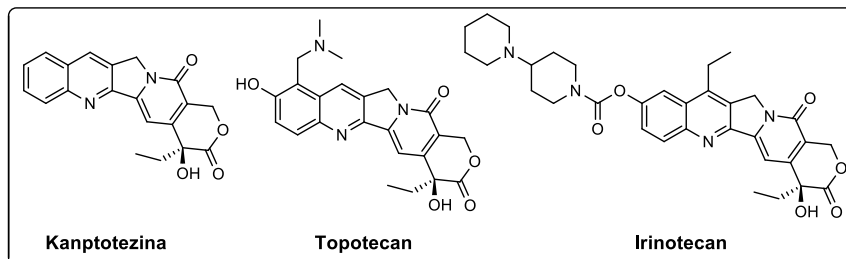
1. Sarrera eta motibazioa (Formatu orokorra eta bibliografia)

Topoisomerasak DNAREN topologian eragiten duten entzimak dira, DNA kate bikoitza kiribiltzen edo deskiribiltzen dute beharren arabera (Pommier, 1998). I topoisomerasa hain zuzen, DNAREN kate batean ebakia eginez kate bikoitza deskiribiltzen du tentsio suprahelikoidala murrizteko, hortaz, ezinbesteko entzima da ziklo zelularren hainbat prozesuetarako (erreplikazioa, transkripzioa eta konponketa) (Pommier, 1998).

TopI-a interes handiko iturri biomolekularra bilakatu da Kimika Medikoko arloan: giza TopI-aren inhibitzaileak diren kanptotezinaren deribatuak gaur egun klinikan minbiziaren tratamendurako farmako bezala erabiltzen dira (beste egitura kimikoa duten hainbat konposatu ere fase preklinikoan daude) (Pommier, 2009); Gainera, Leishmaniaren eta *Mycobacterium tuberculosis*aren TopI-ak (LTopIB eta MtopoI hurrenez hurren) ere iturri terapeutikotzat ikertzen ari dira, hauen inhibitzaileak

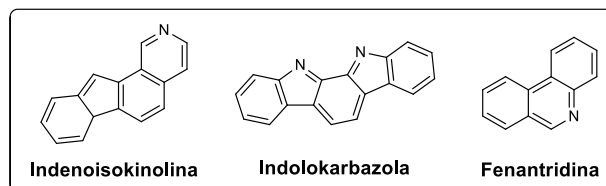
gaixotasun hauen aurkako potentziala aurkezten dutela ikusita (Balaña-Fouce et al., 2012) (Green et al., 2013).

1. irudia. Kanptotezina eta deribatuaren egitura kimikoa



Lehen esan bezala, TopI-aren inhibitzaileetatik soilik kanptotezinaren deribatuak daude klinikoki onartuta minbiziaren tratamendurako (Topotecan eta Irinotecan), baina konposatu hauek hainbat limitazio fisiko-kimiko aurkezten dituzte: alde batetik, laktona eraztuna ezinbestekoa da bere eraginkortasun biologikorako, baina aldi berean bere ezegonkortasun kimikoa eragiten du, erraztasunez zabaltzen delako (Zihou et al., 1994). Bestetik, bere administrazioan eragin zuzena duten disolbagarritasun arazoak ere aurkezten dituzte (Martino et al., 2017). Muga hauek gainditzeko kanptotezinaren deribatuak (CPT deribatuak) ez diren beste konposatu kimiko batzuk garatu dira, non hauetako batzuk fase preklinikoan daude jada (Pommier, 2009).

2. irudia. Kanptotezinaren deribatuak ez diren TopI-ren inhibitzaileen oinarritzko egitura esanguratsuak (heteroziklo nitrogenatuak)



Hau dena kontuan hartuz, TopI-aren inhibitzaile berrien garapena interes zientifiko handiko ikerketa arloa iruditzen zaigu eta Kimika Organikoko saila bezala ekarpen garrantzitsua egin dezakegula uste dugu, TopI inhibitzaile berrien diseinu arrazionala eginez (egitura-aktibitate erlazioak Docking Molekularreko metodologia osagarriekin burutuz), sintesiako metodologia egokiak ikertuz eta garatuz, eta gure sailean ezarritako entsegu biologikoekin aktibitate biologikoa aztertuz. Hori dela eta, gure ikerketa taldean lehen belaunaldiko TopI-aren inhibitzaileak garatu ziren eta orain, optimizazio prozesu iteratibo baten bitartez (diseinua, sintesia eta emaitza biologikoen artekoa) aktibitate biologikoa hobetzeko helburuarekin egitura aldaketak proposatzen ditugu.

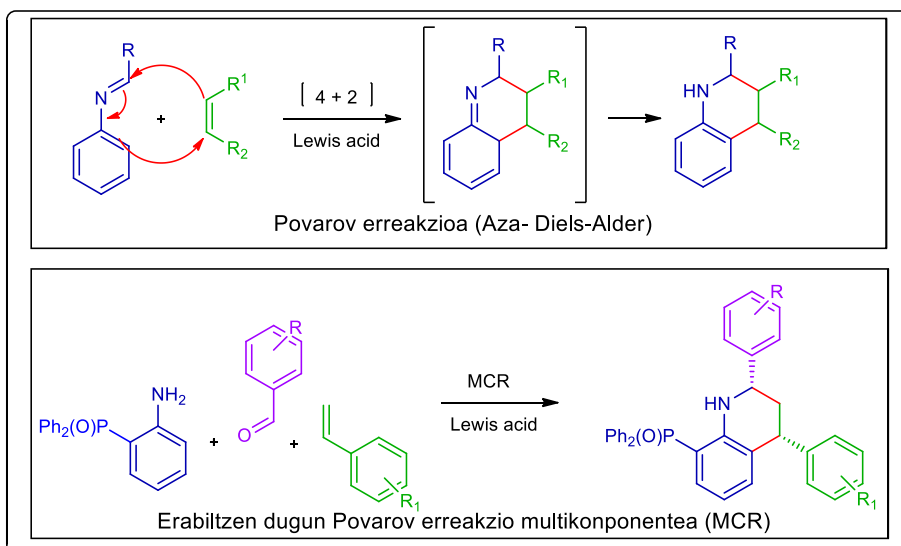
2. Arloko egoera eta ikerketaren helburuak (Azpiatalak eta zerrendak)

Lehen aipatu dugun bezala, TopI-a itu terapeutiko garrantzitsua da gaur egun eta honen inguruan TopI-aren inhibizioaren ikerketa gai interesgarria bilakatu da.

Interes zientifiko honi erantzuna emanez, gure ikerketa taldean naftiridina egitura duten lehen belaunaldiko TopI-aren inhibitzaileak garatu izan dira eta konposatu hauen aktibitate inhibitzailea, antiproliferatiboa, antileishmaniasikoa eta antituberkulosoak neurtu izan da (Alonso et al., 2014). Emaitzek balio itxaropentsuak aurkeztu zituzten, konposatuak TopI-aren inhibitzaile bezala eraginkorrak direla ondorioztatuz eta serie berrien diseinu eta prestaketarako ateak irekiz. Hortaz, aurreko ikerketen emaitzei jarraipena emateko, lan honetan biltzen diren fosforodun kinolina deribatuen diseinua, sintesia eta ebaluazio biologikoa proposatu da, aurreko belaunaldiko konposatuen aktibitatea hobetzeko helburuarekin eta CPT deribatuen limitazio fisiko-kimikoak gainditzeko dituztenak.

Lan honetako konposatu familien sintesi kimikorako Povarov erreakzioa aukeratu da, bertsio multikonponentean. Era honetan, fosforodun kinolina deribatuak metodologia sintetiko eraginkor eta garbi batez prestatzen dira (Lavilla et al., 2018), modu erraz batean egitura-aldakortasun handiko serieak errendimendu altuekin lortuz (Alonso et al., 2018).

3. irudia. Povarov erreakzioa eta lan honetarako erabili dugun Povarov erreakzio multikonponentea



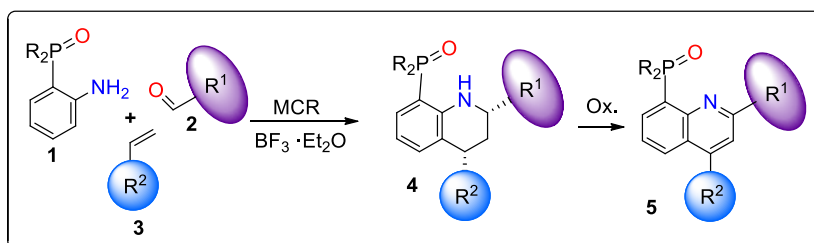
Ikerketa lan honen helburuak honako hauek dira:

- Povarov erreakzio multikonponentearen bidez, proposatutako fosforodun kinolina deribatuak sintetizatzea, ordezkatzailerik ezberdin anitzekin.
- Prestatutako konposatuen ebaluazio biologikoa burutzea: TopI-aren inhibizio entseguak eta aktibitate antiproliferatiboa neurtzeko *in vitro* zitotoxizitate entseguak.
- Lortutako emaitzak aztertzea eta hurrengo konposatu serieen diseinurako erabiltzea, lortutako emaitzak SAR metodologiarekin (egitura-aktibitate erlazioak) eta Molecular Docking azterketekin lagunduta aldaketa estrukturalak egiteko behar izanez gero.

3. Ikerketaren muina

Lan honetan, Povarov erreakzioaren bitartez fosforodun kinolina deribatuak sintetizatu ziren (fosfanoxido taldea dutenak alegia), non fosforodun anilina batek (1), aldehido batek (2) eta olefina batek (3), erreakzio multikonponente baten bidez (4) tetrahidrokinolinak ematen dituzte. Ondoren, tetrahidrokinolinak deshidrogenatu ziren (5) kinolina aromatikoak eskuratzeko. 4. irudian erabilitako sintesi bidea ikus daiteke.

4. irudia. Kinolina deribatuaren sintesi bidea

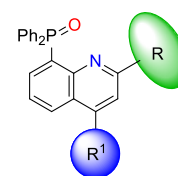
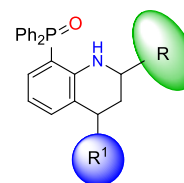


Ondoren, konposatuen ebaluazio biologikoa burutu zen. Alde batetik, TopI-aren inhibizio entseguak egin ziren, non elektroforesi bitartez sintetizatutako konposatuak kanptotezina TopI-aren inhibizio aktibitatearekin alderatzen den. 1.taulan lortutako emaitzak irudikatzen dira. Oro har, prestatutako konposatuek inhibizio ahalmen esanguratsua lortu dutela ondorioztatu daiteke.

1. taula. Konposatuen TopI-ren inhibizio entseguaren emaitzak

R ₁	R ₂	Inhibizioa		
		15''	1'	3'
Ph	Ph	++	++	-
o-MeO- C ₆ H ₄	Ph	+++	+++	++
1-naftil	Ph	++	++	+
p-F-C ₆ H ₄	p-F-C ₆ H ₄	++	++	+
Ph	p-Me-C ₆ H ₄	+	+	-
Kanptotezina		++	++	-

R ₁	R ₂	Inhibizioa		
		15''	1'	3'
Ph	Ph	++	++	-
o-MeO- C ₆ H ₄	Ph	+++	+++	++
1-naftil	Ph	+++	+++	++
p-F-C ₆ H ₄	p-F-C ₆ H ₄	++	++	-
Ph	p-Me-C ₆ H ₄	-	-	-
Kanptotezina		++	++	-



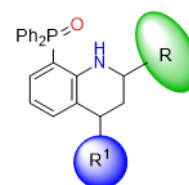
(- aktibitaterik ez, +++ kanptotezina baino aktibitate handiagoa, ++ kanptotezina adinako aktibitatea, + kanptotezina baino aktibitate gutxiago)

Bestalde, *in vitro* zitotoxizitate entseguak burutu ziren konposatuen aktibitate antiproliferatiboa neurtzeko. Horretarako, hainbat minbizi-lerro zelular erabili ziren (A-549 giza birika adenokartzinoma, SKOV-3 giza obario adenokartzinoma) eta lerro zelular osasuntsu bat kontrol bezala (MRC-5 giza birika fibroblastoak). Orokorrean, konposatuek

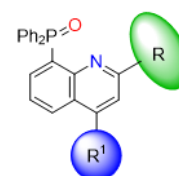
aktibitate antiproliferatibo ona aurkeztu dute minbizi-lerro zelularretan eskala mikromolarrean (bereziki A-549 lerroan), eta ez dute aktibitate zitotoxikorik erakutsi lerro osasuntsuan. Emaitzak xehetasun handiagoz ikusi daitezke 2. taulan.

2. taula. Konposatuen zitotoxizitate balioak linea zelular ezberdinetan

R ₁	R ₂	A-549 IC ₅₀ ± d.e.	SKOV-3 IC ₅₀ ± d.e.	MCR-5 IC ₅₀ ± d.e.
Ph	Ph	1,72±0,20	>50	>50
o-MeO- C ₆ H ₄	Ph	0,21±0,03	>50	>50
1-naftil	Ph	3,57±0,31	>50	>50
p-F-C ₆ H ₄	p-F-C ₆ H ₄	0,25±0,03	17,79±5,45	>50
Ph	p-Me-C ₆ H ₄	1,20±0,12	>50	>50
Kanptotezina		(1,0±0,06)·10 ⁻³	(5,5±0,01)·10 ⁻³	-



R ₁	R ₂	A-549 IC ₅₀ ± d.e.	SKOV-3 IC ₅₀ ± d.e.	MCR-5 IC ₅₀ ± d.e.
Ph	Ph	1,21±0,68	14,46±2,27	>50
o-MeO- C ₆ H ₄	Ph	3,11±0,65	13,06±1,80	>50
1-naftil	Ph	6,32±1,09	>50	>50
p-F-C ₆ H ₄	p-F-C ₆ H ₄	3,82±0,42	6,77 ± 0,85	>50
Ph	p-Me-C ₆ H ₄	7,65±0,90	17,38±1,58	>50
Kanptotezina		(1,0±0,06)·10 ⁻³	(5,5±0,01)·10 ⁻³	-



4. Ondorioak

Ordezkatzaile anitzez funtzionalizatutako fosforodun kinolina deribatuak sintetizatu dira Povarov erreazio multikonponentearen bitartez, P(O)Ph₂ fosforodun taldearekin.

Prestatutako produktuei ebaluazio biologikoa egin zaie TopI inhibizio aktibitatea eta aktibitate antiproliferatiboa neurtzeko. Oro har, konposatuek TopI-ren inhibizio balio esanguratsuak aurkeztu dituzte eta *in vitro* zitotoxizitate balio onak ere lortu dituzte hainbat minbizi-lerro zelularretan (eskala mikromolarrean), eta ez dute eragin zitotoxikorik aurkeztu MRC-5 lerro-zelularrean (osasuntsua).

5. Etorkizunerako planteatzen den norabidea

Lan honetatik abiatuta, berehalako etorkizunerako hainbat erronka planteatzen dira. Alde batetik, egitura-aktibitate erlazio azterketa egitea proposatzen da PO(OEt)₂ taldearekin, eta etil fosfonatoa erabili ordez tamaina handiagoko bat erabiliz (isopropil fosfonatoa alegia). Bestetik, sintesia era jasangarriago batean egitea ahalbidetuko lukeen estrategia sintetikoa proposatzen da, Povarov erreazio auto-oxidatiboa delakoa, oxidatzaile kimiko klasikoak erabili ordez.

Aurrekoaz gain, prestatutako konposatuek agente antileishmaniasiko bezala duten potentziala ebaluatuko da, *Leishmania infantum* espeziearen TopIB-arekiko duen aktibitate inhibitzailea aztertuz eta espezie honen promastigote zein makrofago barneko amastigoteetan duten aktibitate antileishmaniala ikertuz.

6. Erreferentziak

- Alonso C. et al., (2014): "Synthesis and biological evaluation of 1,5-naphthyridines as topoisomerase I inhibitors. A new family of antiproliferative agents", *Curr Top Med Chem.*, 14, 2722-2728.
- Alonso C. et al., (2018): "Novel topoisomerase I inhibitors. Syntheses and biological evaluation of phosphorus substituted quinoline derivatives with antiproliferative activity", *Eur J Med Chem.*, 149, 225-237.
- Balaña-Foce R. et al. (2012): "Indotecan (LMP400) and AM13-55: two novel indenoisoquinolines show potential for treating visceral leishmaniasis, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 56, 5264-5270.
- Green K.D. et al. (2013): "Resistance in tuberculosis: what do we know and where can we go?", *Front Microbiol.*, 4 (208), 1-7.
- Lavilla R. et al., (2018): "Recent advances of the Povarov reaction in medicinal chemistry", *Drug Discovery Today: Technologies*, 29, 71-79.
- Martino E. et al., (2017) "The long story of camptothecin: From traditional medicine to drugs", *Bioorg Med Chem Lett.*, 27, 701-707.
- Pommier Y. (1998): "Diversity of DNA topoisomerases I and inhibitors", *Biochimie*, 80, 255-270.
- Pommier Y. (2009): "DNA Topoisomerase I Inhibitors: Chemistry, Biology, and Interfacial Inhibition", *Chem. Rev.*, 109, 2894-2902.
- Zihou M. et al., (1994) "Differential Interactions of Camptothecin Lactone and Carboxylate Forms with Human Blood Components", *Biochemistry*, 33, 10325-10336.

7. Eskerrak eta oharrak

Eskerrak eman nahi dizkiot nire ikerketa lerroko kideei, Gloria Rubiales, María Fuertes eta Endika Martín doktoreei eta bereziki nire tesi zuzendariei, Patxi Palacios profesoreari eta Kontxi Alonso doktoreari. Baita EHUKo Gasteizko Kimika Organikoa I saileko beste kide guztiei, eta gure ikerketetarako dirulaguntza eman dizkiguten erakunde publikoei ere (Eusko Jaurlaritza eta Espainiar Ekonomia, Industria eta Kompetitibitate Ministerioa).