IV. IKERGAZTE

NAZIOARTEKO IKERKETA EUSKARAZ

Kongresuko artikulu-bilduma

ZIENTZIAK ETA NATURA ZIENTZIAK

2021eko ekainaren 9, 10 eta 11
GASTEIZ, EUSKAL HERRIA

ueu

(c) 2021 Udako Euskal Unibertsitatea (UEU)
Euskal Herriko Unibertsitatea (UPV/EHU), Nafarroako Unibertsitate Publikoa (NUP), Mondragon Unibertsitatea (MU), Deustuko Unibertsitatea (UD), Nafarroako Unibertsitatea (UNAV), Eusko Jaurlaritza, Udalbiltza, Arabako Foru Aldundia eta Vitoria-Gasteizko Udala laguntzaileak izan dira edizio honetan.
(c) Egileak

Editoreak:
Olatz Arbelaitz, Ainhoa Latatu, Miren Josu Omaetxebarria, Blanca Urgell

Artikuluak *Creative Commons* Aitortu-PartekatuBerdin 3.0 lizentziapean daude

ISBNa: 978-84-8438-785-5 Lan osorako
ISBNa: 978-84-8438-790-9 5. liburukia
DOI: https://dx.doi.org/10.26876/ikergazte.2021.05

Harremanetarako: argitalpenak@ueu.eus
UEU. Erribera 14 1 D. 48005 Bilbo. Tel.: 94 679 05 46

•

ZIENTZIAK ETA NATURA ZIENTZIAK

Aurkibidea

Hitzaurrea....7

Batzordeak, laguntzaileak eta hizlariak....9

ACT toxina eta mintzeko kolesterolaren arteko elkarrekintzaren azterketa, *Jone Amuategi Aulestiarte, Asier Benito Vicente, David González Bullón, Rocio Alonso Estrada, Cesar Martín Plágaro* eta *Helena Ostolaza Etxabe* 13

Ikusezina ikusgai bihurtzearen erronka: analisi bideratutik ez-bideratura jauzia bereizmen altuko masa espektrometriari esker, *Mikel Musatadi Larrucea, Maitane Olivares Zabalandicoechea, Ailette Prieto Sobrino* eta *Olatz Zuloaga Zubieta*....21

Idiazabal gaztaren ikerketa metagenomikoa: gaztagilearen eta heltze denboraren eragina mikrobiotan, *Gorka Santamarina García, Igor Hernández, Gustavo Amores* eta *Mailo Virto*....29

Glifosato herbizidak eragindako oxidazio-estresa *Amaranthus palmeri* belar txarrean, *Mikel Vicente Eceiza, Miriam Gil-Monreal, Ana Zabalza* eta *Mercedes Royuela*....37

Zamorako zeramiken beiratua egiteko zeramikariek erabilitako galenaren jatorrizko meatzearen identifikazioa, berun isotopoen analisiaren bidez, *Uxue Sanchez-Garmendia, Kjell Billström, Melanie Kielman, Jeremy Bellucci, Ellen Kooijman, Gorka Arana* eta *Javier Garcia Iñañez*....45

Gaur egungo ikerketa geologiko baten nondik norakoak: Kretazeoko hiperestentsioari loturiko hidrotermalismoaren zantzuak Euskokantauriar arroan, *Martin Ladron de Guevara, Arantxa Bodego* eta *Eneko Iriarte*....53

Euskal kostako bi estuarioren osasun egoeren azterketa, organismo zentinela moduan muskuiluak erabilita, *Anne San Román Martínez* eta *Beñat Zaldibar Aramburu*....59

Fe_3O_4-zko Nanopartikulak: Kantzerraren Aurkako Hipertermia Magnetikoa, *Ander Barón, Daniela Iglesias, Irati Rodrigo, Idoia Castellanos, Maite Insausti*....67

Polimero biobateragarrien garapena biomedikuntzan erabiltzeko, *Julia Sánchez, Antonio Veloso, Leire Ruiz, Leyre Perez, Jose Manuel Laza, Isabel Moreno* eta *José Luis Vilas*....73

Ontze denborak zaldi-haragian duen eragina: kontsumitzaileen iritzia, *Lorea R. Beldarrain, Iñaki Etaio, Luis Javier R. Barron, Kizkitza Insausti* eta *Noelia Aldai* 79

Infusioen ahalmen antioxidatzailearen determinazioa Folin-Ciocalteu erreakzioa eta irudi digitalen analisi bidez, *Jokin Ezenarro, Ane Bordagaray* eta *Rosa García-Arrona*....87

Behi esnearen gantz edukiaren determinazioa NIR espektroskopia eta kimiometria erabiliz, *Jokin Ezenarro, Iker García* eta *Miren Ostra*.....95

Aspergillus nidulans onddoaren garapenaren kontrol genetikoa: FlpA ustezko ziklinaren identifikazioa eta ezaugarritze funtzionala, *Ziortza Agirrezabala, Ainara Otamendi, Eduardo Espeso,* eta *Oier Etxebeste*.....103

BM15, BM18, BM29, BM36, BM39 konposatuen jarduera leishmanizidaren azterketa, *Aroia Burguete* eta *Paul Nguewa*.....111

Maneiu estentsibopean ekoiztutako behor esnea abeltzaintza-dibertsifikazio moduan: Esnearen kalitatearen azterketa, *Ana Blanco-Doval, Maria Angeles Bustamante, Luis Javier Rodriguez Barron* eta *Noelia Aldai*.....115

Arazketa lohietatik eratorritako balio erantsi altuko ongarri seguruen ekoizpena, *Nagore Guerra, Belén Puyuelo* eta *Sergio Ponsá*.....123

Esofagitis Eosinofilikoaren RNA bidezko diagnostiko ez inbaditzailerako proposamen berria, *Maialen Sebastian de la Cruz, Koldo Garcia Etxebarria, Luis Manuel Mendoza, Carol Julyssa Cobian, Sonsoles Tamarit, Jose Ramon Bilbao, Luis Bujanda, Alfredo J. Lucendo* eta *Ainara Castellanos Rubio*.....131

Sentinel-2 irudiekin erretako eremuak detektatzeko algoritmoa eta produktua Saharaz hegoaldeko Afrikan, *Ekhi Roteta* eta *Aitor Bastarrika*.....137

Auxinak induzitutako degron (AID) sistemaren garapena funtzio ezezaguna duen proteina baten testuinguruan, *Alejandro García-Aldama, Endika De la Iglesia, Asier Fullaondo, Jone Mitxelena* eta *Ana María Zubiaga*.....145

Kannabinoideak pilula gisa: enkapsulazio egonkorra posible ote?, *Aitor Villate, Izaga Delgado, Maitane Olivares, Nestor Etxebarrria* eta *Aresatz Usobiaga*.....153

Laser ultralabur baten bidezko urrezko estaldura meheen ablazioa, *Lorea Armendariz, Ainara Rodriguez, Aldara Pan, Oihane Beldarrain* eta *Gabriel Alejandro López*.....161

Efektuei Bideratutako Analisia ospitaleko efluenteetan disruptore endokrino potentzialen detekziorako legamia bidezko *in-vitro* biosaioaz baliatuz, *Naroa Lopez Herguedas, Alicia Cano, Belén González Gaya, Iker Alvarez Mora, Leire Mijangos, Maitane Olibares, Ailette Prieto, Nestor Etxebarria* eta *Olatz Zuloaga*.....169

Irudi-analisi eta machine learning bidezko itsas-triku enbrioi biosaioaren automatizazioa, *Iker Alvarez, Leire Mijangos, Naroa Lopez, Harkaitz Eguiraun, Jose Manuel Amigo, Mathilde Monperrus* eta *Nestor Etxebarria*.....175

2 motako diabetesari asoziaturiko RNA ez-kodetzaile batek 2 transglutaminasa genearen adierazpena erregulatzen du pankreako beta zeluletan, *Itziar Gonzalez-Moro, Maialen Sebastian-Delacruz, Henar Rojas-Márquez, Ane Olazagoitia-Garmendia, Jon Mentxaka Salgado, Luis Manuel Mendoza, Aina Lluch, Francisco José Ortega, Ainara Castellanos-Rubio* eta *Izortze Santin*.....181

Litioaren toxikotasuna muskuiluetan, *Nadezhna Fraga Jesús, Urtzi Izagirre Aramayona* eta *Pamela Ruiz Rodriguez*.....189

Foto-polimerizazio bidezko itsasgarrien gogortzea, *Nora Almandoz* eta *Haritz Sardon*.....197

Fluxu-jarraiko polimerizazioa poliuretanoak prestatzeko: abantailak eta aukerak, *Xabier Lopez de Pariza Sanz, Tim Erdmann, Pedro Luis Arrechea, Nathaniel Park, James L. Hedrick* eta *Haritz Sardon*.....205

Gainazaleko teknika elektrikoen erabilera tektonika aktiboaren ikerketan: tomografia elektrikoa (ERT) eta polarizazio induzitua (IP), *Asier Madarieta-Txurruka, Victor Tendero-Salmerón, Jesús Galindo-Zaldívar* eta *Lourdes González-Castillo*.....213

Biomolekulen elkarrekintzak eta fotofisika aztertzen laser espektroskopiaren bidez, *Iker Lamas, Ander Camiruaga, Maider Parra, Imanol Usabiaga* eta *Raul Montero*.....221

Sulfonamida antibiotikoen determinazioa zoruan, *Sara Martin, Leire Mijangos, , Nestor Etxebarria, Ailette Prieto, Maitane Olivares* eta *Olatz Zuloaga*.....229

Molekulen elkarrekintzen eragina materia makroskopikoaren antolaketan: Teobromina molekularen nukleazioaren bidez, *Imanol Usabiaga, Maider Parra, Ander Camiruaga, Iker Lamas* eta *Antonio Veloso*.....235

Fosfato kontzentrazioaren eta pH-aren determinazioa kolirio laginetan irudi digitalen analisia erabiliz, *Irati Berasarte, Ane Bordagaray, Rosa Garcia-Arrona, Miren Ostra* eta *Maider Vidal*.....241

Nanopartikulen lipido konposizioak rHDLen kolesterol kanpora-fluxuaren efizientzian eragina du, *Shifa Jebari, Kepa B. Uribe, Asier Benito-Vicente, Unai Galicia-García, Asier Larrea-Sebal, Iraide Alloza, Koen Vandenbroeck, Helena Ostolaza* eta *Cesar Martín*.....249

Presa handi baten hustuketak eragindako efektu ekologikoak: Enobietako urtegiaren kasua (Artikutza, Nafarroa), *Miren Atristain, Aitor Larrañaga, Daniel von Schiller* eta *Arturo Elosegi*.....257

Erretikulu endoplasmatikoaren eta Mitokondriaren arteko konexioek mtDNA-ren erreplikazioan duten inplikazioa, *Amaia Lopez de Arbina, Nerea Osinalde* eta *Ian Holt*.....265

ATAD3 gene-familian *de novo* duplikazioek Harel-Yoon sindromea sortzen dute, eta kolesterolaren eta mitokondrien metabolismoan kalteak eragiten dituzte, *Mikel Muñoz-Oreja, Adam Gunning, Uxoa Fernandez-Pelayo, Romina Durigon, Antonella Spinazzolla, Sian Ellard* eta *Ian Holt*.....273

Manganeso dioxidozko superkondentsadore hibridoen karakterizazio elektrokimikoa, *Jon Rodriguez-Romero, Eider Goikolea Nuñez* eta *Idoia Ruiz de Larramendi Villanueva*.....281

Txakurren eta Andeetako azerien arteko parasitoen transmisioa ulertu nahian, Txileko paisaia antropikoan, *Aitor Cevidanes, Claudia Ulloa, Sophia Di Cataldo, Maria Stefania Latrofa, Daniel Gonzalez-Acuña, Domenico Otranto* eta *Javier Millán*.....289

Nikel estaldura bainuetan hipofosfito edukiaren kontrola metodo zinetiko eta kolorimetriko baten bitartez, *Gorka Albizu, Mikel Gutierrez, Miren Ostra* eta *Maider Vidal*.....297

PEF polimeroaren birziklapen zirkularra, *Elena Gabirondo Amenabar, Antxon Martínez de Ilarduya, Haritz Sardon* eta *Sergio Torres-Giner*.....305

Grafeno oxidoak bakarrik eta adsorbatutako bentzo(a)pirenoarekin itsas muskuiluetan eragindako kalteak, *Nagore Gonzalez Soto, Eider Bilbao* eta *Miren P. Cajaraville*.....313

IKERGAZTE 2021
Nazioarteko Ikerketa Euskaraz
HITZAURREA

Denbora laburrean UEUk 50 urte beteko ditu eta, sortu zenetik, euskal komunitate zientifiko-intelektuala trinkotzea izan da UEUk izan duen helburu garrantzitsuenetako bat. Elkarren berri izatea eta elkarrekin ekitea ezinbestekoa da ezagutzak aurrera egin dezan, are gehiago gure kasuan, ikerketan dihardugun pertsona euskaldunok, gure lanaren parterik handiena atzerriko hizkuntzetan egitera behartuta egonik, elkarren berri izatea zaila denean. Ildo horretatik, UEUk hainbat arlotako aditu, aritu eta ikertzaileak biltzen ditu zenbait ekimenetan hainbat ezagutza-arloren inguruan: Informatikari Euskaldunen Bilkurak (11 edizio), Historialari Euskaldunen Topaketak (5 edizio), Hizkuntzalari Euskaldunen Topaketak (4 edizio), Matematikari Euskaldunen Bilkura (4 edizio), Osasun Zientzietako topaketak (3 edizio) eta Natur Zientzietako ikertzaileen bilkurak (4 edizio), besteak beste, horren adibide argiak dira.

Bilkura horiei guztiei IkerGazte kongresua gehitu zitzaien 2015eko maiatzean. Ikerketa, euskara, gazteak eta diziplinartekotasuna izan ziren bilgune haren osagai nagusiak. Durangon hasitako bideak jarraipena izan zuen 2017an Iruñean eta 2019an Baionan. Aurtengoan Gasteiz dugu topagune, ekainaren 9, 10 eta 11n, Vitoria/Gasteizko Europa Biltzar Jauregian 180 ikertzailetik gora bilduko gara. Laugarren edizio honek erakusten digu 2015ean ziurgabetasun handiz hasitako bideak ikertzaile euskaldunok biltzeko dugun premiak eta beharrak irauten duela. Beste behin ere, ikergazteen eskutik jasotako ekarpen kopuruak IkerGazte behar-beharrezkoa dela ematen digu aditzera.

“IkerGazte2021: Nazioarteko Ikerketa Euskaraz” goiburu duen kongresuaren artikulu-bilduma dugu hau. Izenburu horretan 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 euskalduneko ikertzaileak bildu eta elkarren berri izatea da, arlo guztiak jorratuz; hasi humanitateetatik eta gizarte-zientzietatik, eta zientzia zehatz, natur zientzia, ingeniaritza, arkitektura eta osasun-arloetako gaietaraino. Nazioartean ingelesez argitaratu ohi diren lanak euskaraz ere argitaratzeko eta zabaltzeko aukeraren aldeko apustua da.

Honelako kongresu bat aurrera ateratzeko ezinbestekoa da bai banakoen lan eskerga, baita erakunde publiko eta pribatu ugariren laguntza ere: UEUko lantaldetik hasita, UEUkideak, eta bereziki Arabako kideak, IkerGazteren Batzorde Zientifikoko ikertzaileak, babesleak, laguntzaileak (unibertsitateak, ikerketa-taldeak zein aldizkari zientifikoak) bai eta komunikabideak ere. Bestalde, Gasteizko Udalak eta Udalbiltzak sariak babestu dituzte. Horrez gain, hainbat pertsonak eta komunikabidek erakutsitako atxikimendua ere aipatu nahi dugu. Esker mila guztiei.

Laugarren edizioa du aurtengoan IkerGaztek, eta COVID-19a dela-eta sortutako osasun-krisiari loturik antolatu behar izan dugu. Osasun-neurri zorrotzek baldintzatuta, egitaraua zertxobait moldatu behar izan dugu, aldibereko ekintza paraleloak murriztuz. Hala ere, egitaraua interesgarria eta erakargarria da, arlo guztietako ekarpenak biltzen dituena. Inoiz baino komunikazio gehiago jaso ditugu, 58 ahozko aurkezpen eta 92 poster moduko aurkezpenetan aurkeztuko direnak. Guztira 150 komunikazio.

Hasieran, 163 komunikazio jaso baziren ere, gainbegiratze-prozesua gainditu eta kongresuan parte hartzeko ikertzaileen baieztapena jaso duten 150 lanak daude bilduma honetan.

Jakintza-arloei dagokienez hauek dira zenbakiak:

Giza Zientziak eta Artea	18
Gizarte Zientziak eta Zuzenbidea	39
Zientzia Zehatzak eta Natur Zientziak	42
Ingeniaritza eta Arkitektura	24
Osasun Zientziak	27

Ikertzaileen filiazioari dagokionez, aurreko edizioetako joera mantentzen da. Horrela, bost liburu hauetan jasotako komunikazioetan Euskal Herriko Unibertsitatea (UPV/EHU) da maizen aipatu dena, 74 ekarpenekin. Ondoren Mondragon Unibertsitatea da ugariena, 11 ekarpenekin, aurreko edizioetako ekarpen kopurua bikoiztuz. Nafarroako Unibertsitate Publikoa eta Nafarroako Unibertsitatetik 4na ekarpen jaso ditugu edizio honetan. Deustuko Unibertsitatetik komunikazio bat jaso da. Beste ekarpen batzuk honako unibertsitate hauetatik jaso dira: Bartzelonako Unibertsitate Autonomoa, Bordeleko Unibertsitatea, University of Illinois at Urbana-Chamapaign, Vic-eko Unibertsitatea eta Granadako Unibertsitatea.

Unibertsitateei atxikitako ikerketa-zentroak eta taldeak aipatzen dira ekarpenetako askotan, beherago aipatzen diren ikertalde laguntzaileez gain, honakoak aurki ditzakegu: PIE, UNAV-Cima, UNAV-Tecnun, BioDonostia, BioAraba eta BioCruces Osasun Ikerketa Institutuak, BCMaterials, Polymat, CSIC, Ikerlan, Achucarro Basque Center for Neuroscience edo CIC-energyGUNE agertzen dira besteak beste.

Beste unibertsitate, eragile eta erakundeei dagokienez, hauek dira lankidetzan aipatzen diren beste batzuk: Athletic Club, Suediako Naturhistoriska Riksmuseet, Burgosko Unibertsitatea, AOTECH, Coruñako Unibertsitatea, Vigoko Unibertsitatea, Monterreyko Teknologia eta Goi-mailako Ikasketen Institutua (Mexiko) edo Kopenhageko Unibertsitatea beste batzuen artean.

Urte zaila izan da elkarrekin egitasmoak abiatzeko eta hala ere lortu dugu. Bi urtean behin errepikatzeari eutsiko diogu. Beraz, adi, Ikergazte2023 etorriko da-eta!

Olatz Arbelaitz, Blanca Urgell, Ainhoa Latatu eta Miren Josu Omaetxebarria

BATZORDEAK, LAGUNTZAILEAK ETA HIZLARIAK

Batzorde Zientifikoa

Batzordeburua:	Olatz Arbelaitz (UPV/EHU, UEU) eta Blanca Urgell (UPV/EHU)
Koordinatzailea:	Miren Josu Omaetxebarria (UPV/EHU, UEU)
Idazkaria:	Ainhoa Latatu (UEU)

Giza Zientziak eta Artea

Itziar Aduriz (Bartzelonako Unibertsitatea, UEU)
Agustin Arrieta (UPV/EHU)
Haizea Barcenilla (UPV/EHU)
K. Josu Bijuesca (UD)
Urtzi Etxeberria (CNRS-IKER Euskara eta Euskal Testuen Ikerketa Zentroa)
Aritz Irurtzun (CNRS-IKER, UEU)
Kepa Korta (UPV/EHU)
Elizabete Manterola (UPV/EHU, UEU)
Ismael Manterola (UPV/EHU, UEU)
Blanca Urgell (UPV/EHU)
Eguzki Urteaga (UPV/EHU)

Gizarte Zientziak eta Zuzenbidea

Josu Amezaga (UPV/EHU, UEU)
Amaia Arroyo (MU, UEU)
Aitor Bengoetxea (UPV/EHU, UEU)
Eneko Bidegain (MU, UEU)
Lore Erriondo (UPV/EHU, UEU)
Elixabete Imaz (UPV/EHU)
Mikel Iruskieta (UPV/EHU, UEU)
Xabier Landabidea (UD, UEU)
Libe Mimenza (UPV/EHU, UEU)
Bea Narbaiza (UPV/EHU)
Ixusko Ordeñana (UPV/EHU)
Eneritz Zabaleta (UPPA)

Zientziak eta Natura Zientziak

Noelia Aldai (UPV/EHU)
Arantza Aldezabal (UPV/EHU, UEU)
Estibaliz Apiñaniz (UPV/EHU, UEU)
Arturo Apraiz (UPV/EHU, UEU)
Itziar Aretxaga (INAOE)
Gorka Elordi (UPV/EHU)
Arturo Elosegi (UPV/EHU, UEU)
Nestor Etxebarria (UPV/EHU, UEU)
Kizkitza Insausti (NUP)
Natxo Irigoien (NUP)
Josu Jugo (UPV/EHU, UEU)
Josu Lopez Gazpio (GOI, UEU)
Ane Sarasola (UPV/EHU)
Jone Uria (BCAM)

Ingeniaritza eta Arkitektura

Olatz Arbelaitz (UPV/EHU, UEU)
Gorka Azkune (UPV/EHU)
Ander Goikoetxea (MU)
Enkarni Gomez (UPV/EHU)
Iñigo Lopez Gazpio (UD, UEU)
Jose Miguel Campillo (UPV/EHU, UEU)
Igor Peñalba (UPV/EHU)
Olatz Perez de Viñaspre (UPV/EHU, UEU)
Maialen Sagarna (UPV/EHU)
Arkaitz Zubiaga (University of Warwick)

Osasun Zientziak

Rafael Aldabe (CIMA, UNAV)
Mikel Azkargorta (CIC Biogune)
Nekane Balluerka (UPV/EHU, UEU)
Jose Ramon Bilbao (UPV/EHU, Gurutzetako Ospitalea)
Koldo Callado (UPV/EHU, UEU)
Izaskun Elezgarai (UPV/EHU, UEU)
Iraia Garcia (UPV/EHU)
Xabier Isasi (UPV/EHU, UEU)
Jone Mitxelena (UPV/EHU)
Miren Josu Omaetxebarria (UPV/EHU, UEU)
Nerea Osinalde (UPV/EHU)
Jose Antonio Rodriguez (UPV/EHU)
Izortze Santin (UPV/EHU)

Beste gainbegirale batzuk

Luismi Agirrezabala (UPV/EHU, UEU)
Iñaki Alegria (UPV/EHU, UEU)
Eneritz Anakabe (UPV/EHU, UEU)
Maialen Araolaza (UD, UEU)
Sonia Arrasate (UPV/EHU, UEU)
Unai Atutxa (UPV/EHU)
Eneko Axpe (UPV/EHU)
Jose Luis Ayastuy (UPV/EHU)
Ane Berro (UD)
Ibon Cancio (UPV/EHU, UEU)
Ane Eizagirre (UPV/EHU)
Mari Luz Esteban (UPV/EHU, UEU)
Unai Fernández de Betoño (UPV/EHU, UEU)
Ane Gabilondo (UPV/EHU)
Rakel Gamito Gomez (UPV/EHU, UEU)
Ugutz Garitaonaindia (UPV/EHU)
Jone Miren Hernandez (UPV/EHU)
Karlos Ibarguren Olalde (Osakidetza, UEU)
Amaia Irazusta (UPV/EHU)
Ander Iturriotz (UPV/EHU, UEU)
Maider Iturrondobeitia (UPV/EHU)
Elena Lazkano (UPV/EHU, UEU)

Jose Francisco Lukas (UPV/EHU)
Iñigo Martinez de Alegria (UPV/EHU)
Amaia Nuñez (UPV/EHU)
Fernando Olabarrieta (UPV/EHU, UEU)
Jose A. Pascual (UPV/EHU)
Guiomar Pérez de Nanclares (UPV/EHU)
Luixa Reizabal (UPV/EHU, UEU)
Iratxe Retolaza (UPV/EHU, UEU)
Irantzu Rico (UPV/EHU)
Guadalupe Rivero (UPV/EHU)
Leire Ruiz (UPV/EHU)
Karmele Salaberria (UPV/EHU)
Kepa Sarasola (UPV/EHU, UEU)
Ander Soraluze (UPV/EHU, UEU)
Koldo Telleria (UPV/EHU)
Ekai Txapartegi (UPV/EHU, UEU)
Itziar Txurruka (UPV/EHU)
Imanol Ulacia (UPV/EHU)
Iraultza Unzueta (UPV/EHU)
Iker Villanueva (UD, UEU)
Idoia Zarrazquin (UPV/EHU)
Izaskun Zorita (AZTI, UEU)
Mario Zubiaga (UPV/EHU, UEU)

Batzorde Teknikoa

Ane Sarasua (UEUko idazkari nagusia)
Idoia Torregarai (komunikazio-arduraduna)
Ainhoa Latatu (koordinatzaile akademikoa)
Emilio Delgado (IKT arduraduna)
Ander Altuna (hizkuntza-zuzentzailea)

Ikerketa-talde laguntzaileak

- Catalysis and sustainable polymers ikerketa-taldea (Polymat-UPV/EHU).
- ELEBILAB (UPV/EHUren Elebitasunaren Laborategia)
- Energia biltegiratzeko sistemei buruzko ikerketa-taldea (Mondragon Unibertsitateko Teknologia eta Ingeniaritza alorreko ikerketa-taldea).
- Gaixotasun immuneen genetika funtzionalaren ikerketa-taldea @FunImmune (UPV/EHUko ikerketa-taldea).
- GEZKI Taldea (UPV/EHUko Gizarte Ekonomia eta Zuzenbide Kooperatiboko Institutua)
- IKER Ikerketa Zentroa (Euskara eta Euskal Testuen Ikerketa Zentroa). Ikerketa Zientifikoaren Erakunde Nazionalaren (CNRS), Bordele Montaigne Unibertsitatearen eta Paueko eta Aturri Herrialdeetako Unibertsitatearen (UPPA) gerizpeko ikerketa-gune mistoa (UMR).
- IXA Ikerketa Taldea (UPV/EHUko hizkuntzaren tratamendu automatikoaren inguruko ikerketa-taldea).
- KoLaborategia Ikerketa Taldea (HUHEZI-MUko Gizarte Digitalerako Hezkuntza eta Komunikazioaren Laborategia).
- Materialen ezaugarri termofisikoen ikerketa-taldea (UPV/EHUko ikerketa taldea)
- Minbiziaren biologia molekularraren ikerketa-taldea (UPV/EHUko Genetika, Antropologia Fisikoa eta Animalien Fisiologia Saileko ikerketa-taldea).

- Neuropsikofarmakologia ikerketa-taldea (UPV/EHUko ikerketa-taldea).
- NOR Ikerketa Taldea (UPV/EHUko Ikus-entzunezko Komunikazio eta Publizitate Saileko ikerketa-taldea).
- Parte Hartuz Ikerketa Taldea (UPV/EHUko Gizarte Zientzien esparruko ikerketa-taldea).
- Sinapsi-neuroanatomiaren ultraegitura eta funtziorako laborategia (UPV/EHUko ikerketa-taldea).

Aldizkari zientifiko laguntzaileak

- BAT. Soziolinguistikan eta glotopolitikan espezializatutako aldizkaria.
- EKAIA. Euskal Herriko Unibertsitateko zientzia- eta teknologia-aldizkaria da.
- ELHUYAR ZIENTZIA ETA TEKNOLOGIA aldizkaria.
- GOGOA Euskal Herriko Unibertsitateko Logika, Kognizio, Hizkuntza eta Informaziorako Institutuak (ILCLIk) egindako aldizkaria.
- JAKIN. Giza eta gizarte zientzien alorreko kultur aldizkaria.
- OSAGAIZ. Osasun-zientzien aldizkaria
- SENEZ. EIZIE elkarteak kudeatzen duen itzulpengintzaren arloko aldizkaria.
- TANTAK. Euskal Herriko Unibertsitateko Hezkuntza eta Pedagogiaren arloko aldizkaria.
- UZTARO. UEUk kudeatzen duen giza eta gizarte-zientziei buruzko aldizkaria.

Hizlari gonbidatuak

- Katy Deepwell, Middlesex Unibertsitateko (London) irakasle eta ikertzailea Arte Garaikidearen Teorian eta Kritikan .
- Arantza Diaz de Ilarraza, Euskal Herriko Unibertsitateko Informatika Fakultateko irakasle osoa eta UEUkidea.
- Nuria Oliver, Inteligentzia Artifizialean doktorea (Massachusetts-eko Institutu Teknologikoa, MIT), ELLIS (European Laboratory for Learning and Intelligent Systems) sortzaileetako bat eta bertako lehendakariordea.
- Eneko Axpe, Marie Curie doktoratu osteko ikertzaile bekaduna Stanford University-n, NASA, UPV/EHU.

Mahai-inguruak

- Solasaldia: “Ezagutzaren dibulgazioa, ahalduntzeko tresna”
    - Lorea Agirre. JAKINeko zuzendaria.
    - Uxune Martinez. Euskampus Fundazioaren Kultura Zientifikoko eta Berrikuntza Unitatean, zabalkunde zientifikorako arduraduna. UEUkidea.
    - Ugo Mayor. Ikerbasque Ikerketa Irakaslea UPV/EHUn.
    - Moderatzailea: Idoia Torregarai. Kazetaria eta UEUko komunikazio-arduraduna
- Mahai-ingurua: “K++: Koronabirus osteari buruz esandakoei atzera begirada”
    - Rakel Gamito. UPV/EHUko ikertzaile eta irakaslea. UEUko Pedagogia sailburua.
    - Maite Luengo. Artearen historian graduatua, UPV/EHUren eta Université Bordeaux Montaigneren arteko tutoretza-doktoretza egiten.
    - Anartz Ormaza. Arkitektoa eta hezitzailea da TEO Arkitekturan. UEUko Arkitektura sailburua.
    - Moderatzailea: Xabier Landabidea. Deustuko Unibertsitateko ikertzaile eta irakaslea. Humanitate Digitalen ikerketa-guneko koordinatzailea eta UEUko zuzendaritzako kidea.

ACT toxina eta mintzeko kolesterolaren arteko elkarrekintzaren azterketa

Amuategi, J.[1], Benito, A.[1], González D.[1], Alonso, R.[1], Martin, C.[1] eta Ostolaza, H.[1]
Biokimika eta Biologia Molekularra saila eta Biofisika Institutua (UPV/EHU, CSIC)
jamuategui001@ehu.eus

Laburpena

Gaixotasun kutsakorren artean munduan heriotza gehien eragiten dutenak arnasbideetako infekzioak dira eta horren adibide izan daiteke COVID-19 birusa. Hala ere, badira gizakiak kaltetzen dituzten beste patogeno batzuk ere: *Bordetella pertussis* bakterioak, esaterako, kukutxeztula eragiten du. Bakterio honek ostalaria inbaditzeko erabiltzen dituen mekanismoetako bat adenilato ziklasa toxina da (ACT). Toxina honen eta zelula ostalariaren arteko elkarrekintza sakon ikertu da. Hala ere, zelularen inbasiorako erabiltzen duen mekanismo molekularra oraindik ez da zehaztasunez deskribatu. Ikerketa honetan, mintzeko kolesterolak toxina eta mintzaren arteko elkarrekintzan izan dezakeen eragina aztertu da.

Hitz gakoak: kukutxeztula, *Bordetella pertussis*, Adenilato Ziklasa Toxina, toxina poro eragileak

Abstract

Respiratory infections cause the great majority of deaths among contagious diseases. There are several pathogens that infect humans, for example: Bordetella pertussis bacteria cause whooping-cough. Adenylate Cyclase Toxin (ACT) is one of the mechanisms used by this bacterium to invade the host. The interaction between the toxin and the host cell has been studied in depth. However, the molecular mechanisms used for cell invasion have not been accurately described yet. This study analyses the possible influence of membrane-cholesterol in the toxin/membrane interaction.

Keywords: Pertussis, Bordetella pertussis, Adenylate Cyclase Toxin, pore forming toxins

1. Sarrera

Arnasbideetako infekzioak dira mundu mailako gaixotasun kutsakorrik hilgarrienak. Esaterako, 2019an 2.6 milioi pertsona hil ziren behe arnasbideetako (trakeako, bronkioetako, bronkioloetako edota albeoloetako) infekzioen ondorioz[1]. Azken urtean COVID-19 birusari arreta berezia eskaini zaion arren, gizakiak kutsatzen dituzten beste patogeno batzuk ere oraindik libre dabiltza. Horien artean *Bordetella pertussis* bakterioak kukutxeztula eragiten du, zenbait populaziorentzat infekzio larri eta kutsakorra izan daitekeena (**1A. Irudia**). Eragindako sintomen larritasuna gaixoaren adinaren, immunitate-sistemaren erantzunaren eta bakterioaren barreiatze sistemikoaren araberakoa da. Helduen kasuan ez da oso arriskutsua izaten: etengabeko eztul gertakari zakarrak, arnasa hartzeko zailtasuna, sukarra edota goragalea eragiten ditu. Bestalde, haur jaioberrietan apnea bezalako konplikazioak ohikoak dira eta kasurik larrienetan, biriketako hipertentsioaren eta arnas gutxiegitasunaren ondorioz, heriotza eragin dezake. Kukutxeztula fase goiztiar batean gainditu ez duten gaixoek bigarren mailako pneumonia bezalako konplikazioak garatu ditzakete, horixe izaten delarik kukutxeztulaz hiltzen diren gehienen (% 90) arrazoi nagusia (Kilgore *et al*., 2016). Txerto desberdinen garapenak gaixotasuna kontrolpean izaten lagundu du. Hala ere, biztanleriaren % 95 inguruk txertoa jaso duen arren, azken urteetan kukutxeztul kasuen igoera nabarmena erregistratu da hainbat herrialdetan. Hori dela eta, Osasunaren Mundu Erakundeak (OME) gaixotasunaren gorakada mundu mailan gertatzen ari dela onartu behar izan du[2]. Espainiari dagokionez, 2015ean EAE izan zen kukutxeztul kasu gehien erregistratu zituen autonomia erkidegoa, 100.000 biztanleko 91,67 kasurekin[3]. Irakurleak kukutxeztularen inguruko informazio gehiago jaso nahiko balu, argitaratu dugun berrikuspena irakurtzera gonbidatzen dugu (Amuategi *et al*. 2020).

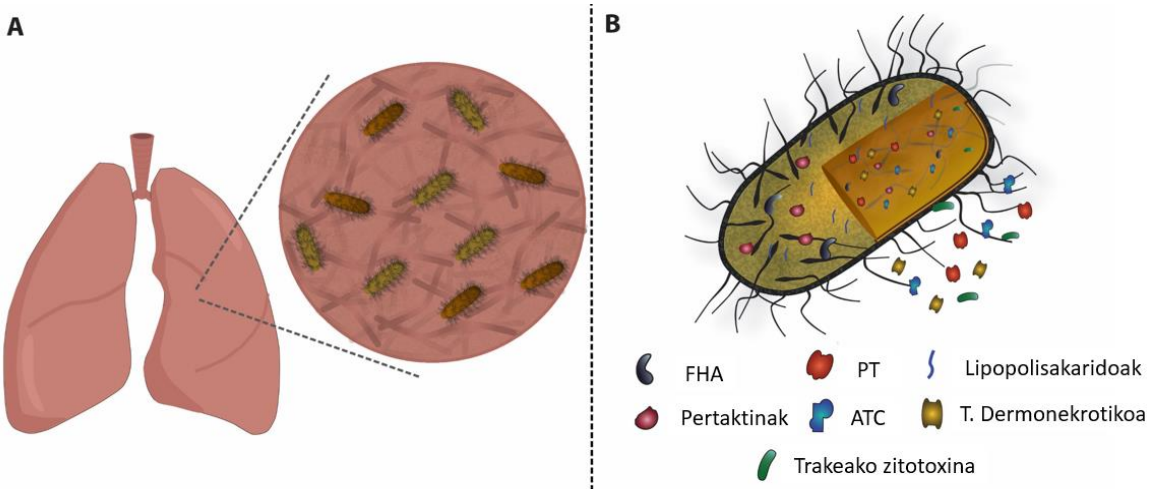
[1] The top 10 causes of death, World Health Organization (WHO): https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death (2021-02-01)

[2] Pertussis, WHO: https://www.who.int/immunization/diseases/pertussis/en/ (2021-02-01)

[3] Tosferina. Adaptación de los protocolos de la RENAVE, Osakidetza: https://www.osakidetza.euskadi.eus/contenidos/informacion/vigilancia_protocolos/es_def/adjuntos/Tosferina_cast_01-03-18.pdf (2021-02-01)

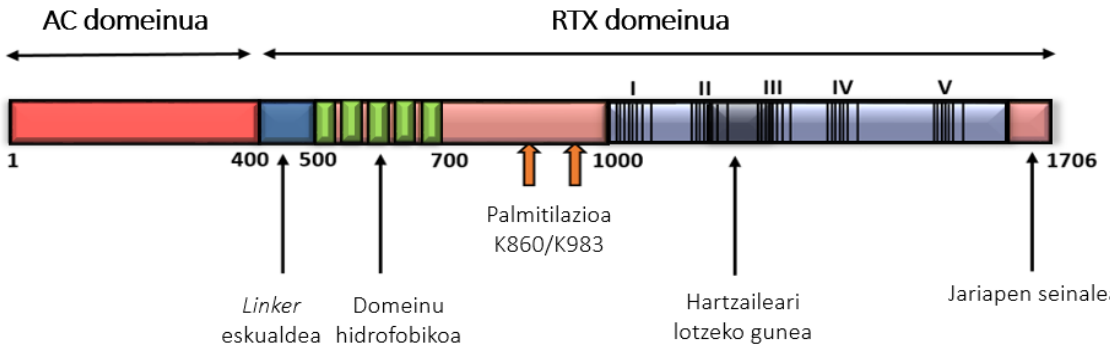
B. pertussis bakterioak inbasio prozesuetan epiteliora itsasteko eta bertako estalkia suntsitzeko hainbat birulentzia-faktore jariatzen ditu (**1B. Irudia)**. Garrantzitsuenak gainazaleko proteinak (Hemaglutinina haritsua, ingelesez *Filamentous Haemagglutinin Adhesin* (FHA) eta pertaktina) eta jariatzen dituen toxinak (Toxina Pertusikoa, ingelesez *Pertussis Toxin* (PT); Trakeako Zitotoxina; Toxina dermonekrotikoa eta Adenilato Ziklasa Toxina, ingelesez *Adenylate Cyclase Toxin* (ACT)) dira. Toxinak zelulak kaltetzen dituzten erremintak dira. Bizi-erreinu guztietan aurki daitezke eta tamaina eta forma anitzak izan ditzakete: kargaturiko atomoetatik hasita, hainbat proteinaz osatutako konplexuetaraino[4]. Horrez gain, lipopolisakaridoen ekoizpenak bakterioak eragindako hantura murrizten laguntzen du.

1. Irudia. (A) *Bordetella pertussis* eta (B) bere birulentzia-faktoreak.



ACTa 1706 aminoazidoz osatutako proteina bat da eta 200 kDa inguruko pisu molekularra du (**2. Irudia)**. Egitura eta funtzio aldetik argi bereiz daitezkeen bi domeinuk osatzen dute: proteinaren hasierako, hots, amino- edo N-muturreko lehenengo 400 aminoazidoek Adenilato Ziklasa (AC) domeinua osatzen dute eta beste 1306 aminoazidoek RTX domeinu hemolitiko edo poro-eragilea. Bi domeinu hauen artean *linker* edo lotura-eskualdea deskribatu da, 400-500 aminoazidoen artean (Subrini *et al*., 2013).

2. Irudia. ACT proteinaren aminoazido sekuentziaren irudi eskematikoa.



ACTa zelula ostalari desberdinetara lotu daiteke: eritrozitoetatik hasita zelula epitelialetara, eta baita immunitate-sistemako zenbait zeluletara ere (Eby *et al*., 2015; Hanski eta Farfel, 1985; Rogel eta Hanski, 1992). Gainera, *Repeats in ToXins* (RTX) toxina poro-eragileen familiako kidea denez (Linhartová *et al*., 2010), mintza alde batetik bestera zeharkatzen duten poroak eratzeko gai da (Fradin *et al*., 2009) eta ondorioz, zelularen lisia eragin dezake. Horretarako, proteinaren domeinu hidrofobikoa eta α-helizeak mintzean txertatzen dira eta proteinaz eta lipidoz osatutako egitura nahiko dinamiko bat eratzen da (González-Bullón *et al*., 2019). Gainera, mintz-egiturak, liposomak artean, iragazkor bihurtzeko gai ere bada (Martin *et al*., 2004). Bestalde, zenbait bakterio-toxinak bezala, zelula ostalariaren barneko itu molekularrak baliatzen ditu hura erasotzeko. Proteinaren AC domeinu katalitikoak, zelularen zitosolean adenosin monofosfato-3´,5´ ziklikoaren (cAMP) kontrolik gabeko sintesia katalizatzen du. Jakina da cAMPak bigarren mezulari gisa jarduten duela zelularen seinaleztapen prozesuetan

[4] Biology Dictionary: https://biologydictionary.net/toxin/ (2021-02-04)

(Yan *et al*., 2016) eta beraz, haren gehiegizko kontzentrazioak zelularen heriotza eragin dezake (Ladant eta Ullmann, 1999). AC domeinuak zelula ostalariaren mintza zuzenean zeharkatzen duela jotzen da. Izan ere, bakterio-toxina gutxi batzuk gai dira translokazio sistema propioak erabiltzeko: difteria toxina, toxina botulinikoa, toxina letala eta ACTa, besteak beste. Zerrendatutako toxinak uretan solugarriak dira, baina, helize hidrofobikoz osaturiko zatiak ere badituzte: esaterako, ACTaren linker eskualdea. Segmentu horiek anfipatikoak izaten dira, hots, mutur hidrofilo eta mutur hidrofobo bana dituzte, eta hortaz, mintzetan txertatu daitezke, horiexek desegonkortuz eta iragazkor bihurtuz. Hainbestez, translokazio prozesua erraztu dezaketela pentsa daiteke *(*Masin *et al*., 2016), lekuko mintzaren osotasuna asaldatzen baitute, domeinu katalitikoa zelula barnera garraiatzeko beharrezko energia gutxituz (Voegele *et al*., 2017). Irakurleak ACTaren inguruko informazio gehiago jaso nahiko balu, erreferentzien ataleko berrikuspen hauek irakurtzera gonbidatzen dugu (Chenal *et al*., 2018; Ladant eta Ullmann, 1999).

2. Arloko egoera eta ikerketaren helburuak

Zenbait patogenok, eta haiek ekoiztutako birulentzia-faktore batzuek, zelula ostalarien mintzeko kolesterola (Chol) ezagutu eta hari lotzeko abilezia garatu dute. Esaterako, kolesterolarekin elkar eragiten duten proteina batzuek beren sekuentzietan *Cholesterol Recognition/interaction Amino acid Consensus* edo CRAC delako motiboak dituztela deskribatu da. Gainera, zenbaitetan kolesterolaren eta CRAC motiboaren artean elkarrekintza zuzen eta espezifikoa dagoela frogatu da (Epand *et al*., 2006; Fantini *et al*., 2016; Fantini eta Barrantes, 2013). Adibidez, RTX familiako beste kide batek, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*ek, ekoiztutako LtxA leukotoxinak ere gaitasun bera daukala deskribatu da. Elkarrekintzarako bi CRAC motibo baliatzen ditu eta horietako bat RTX familiako beste toxina batzuetan ere deskribatu da (Brown *et al*., 2013; Brown *et al*., 2016). Hortaz, horiek CRAC motiboak baldin badituzte, antzekotasunagatik ACTak ere izan ditzakela iradoki genezake.

Laborategiko aurretiazko emaitzei esker ondorioztatu genuen kolesterolak eragina zuela mintzaren eta ACTaren arteko elkarrekintzan. Gainera, kolesterolak AC domeinuaren translokazioa erraztu zezakeela iradoki genuen. Ikerketa honetan, aldiz, kolesterolak aktibitate poro-eragilean zein inplikazio duen aztertu dugu. Horrez gain, ACTa eta mintzeko kolesterolaren artean elkarrekintza espezifikoa egon litekela frogatu nahi izan dugu. Horretarako, helburu zehatzagoak planteatu dira. Lehenik eta behin, kolesterolaren ezagutzarako eskualde posibleak kokatzeko, bilaketa bioinformatiko bat egingo da. Bestalde, aktibitate poro-eragilean kolesterolak izan dezaken eragina aztertzeko, ACTak liposometan eragiten duen solutuen askapena aztertuko da. Esperimentu hauek osatzeko Z potentziala deritzon teknika ere erabiliko da. Azkenik, ACTak eragindako eritrozitoen hemolisia aztertuko da, eta kolesterolez osatutako liposomak hemolisia inhibitzeko gai diren entseatuko da.

3. Ikerketaren muina

3.1. CRAC/CARC motiboen bilaketa bioinformatikoa

CRAC domeinuak motibo labur eta linealak dira. Oso algoritmo sinpleak betetzen dituzte, N-muturretik hasita C-muturrerantz: Leuzina (L) edo Valina (V) hondar apolar bat; jarraian, 1-5 (edozein) hondarrez osaturiko segmentu bat; tirosina (Y) hondar aromatiko bat; berriro 1-5 hondarrez osaturiko segmentu bat; eta bukatzeko, karga positiboa eta polaritate altua dituen Lisina (K) edo Arginina (R) basiko bat: [L/V]-X(1-5)-(Y)-X(1-5)-[R/K]. Proteinen mintz arteko domeinuen parte diren CRAC motiboetan X hondarra mintzeko inguru hidrofobikoarekiko bateragarria izan beharko litzateke. Gainera, C-muturreko hondar basikoa lipido-ura interfasean kokatuko litzateke, mintzarekin elkarrekintza optimoa ziurtatuz. Domeinu hauetan gertatutako mutazio puntualek kolesterolarekiko elkarrekintza gutxiagotu edo ezeztatu dezaketela ere ikusi da (Fantini eta Barrantes, 2013). CARC domeinuei dagokienez, N-muturretik hasita C-muturrerantz [R/K]-X$_{(1-5)}$-(Y)-X$_{(1-5)}$-[L/V] sekuentzia izango lukete. Beraz, “alderantzizko CRAC” domeinuak direla esan daiteke. Hala ere, erdiko aminoazidoak ez du zertan Y izan behar, F ere izan daiteke. Kasu honetan, hondar basiko baten presentziak CARC motiboa mintz-arteko domeinuaren interfase polar-apolarrean kokatzea ahalbidetuko du, justu kolesterola

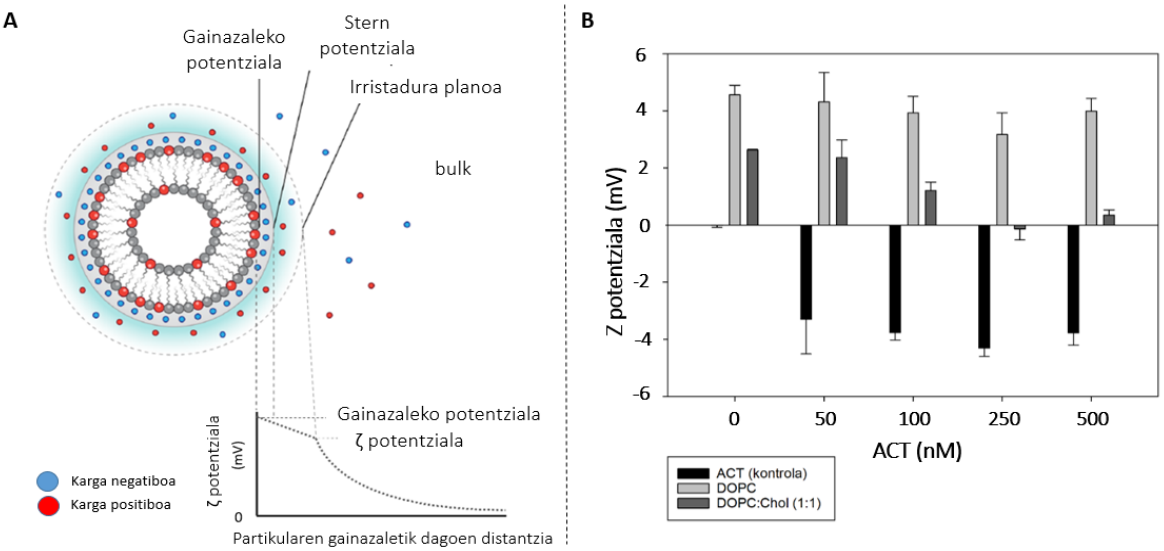
kokatu beharko litzatekeen lekuan. Hala ere, CARC motiboa ez da beti proteinen mintz-arteko guneetan ageri. Halaber, proteina baten mintz-arteko domeinu berak CRAC eta CARC motiboak izan ditzake aldi berean, honek, bi kolesterol molekularen batura ahalbidetuko duelarik (Fantini eta Barrantes, 2013).

EMBROSS fuzzpro4 zerbitzua erabili da ACTaren sekuentzian CRAC etak CARC motiboen bilaketa burutzeko. Era berean, Yren ordez F aminoazido zentrala duten CRAC itxurako motiboen bilaketa ere burutu da. Azterketa honen ondorioz, ACTaren sekuentzian CRAC/CARC/CRAC itxurako 41 motibo posible identifikatu dira: 18 AC domeinuan (2 linker eskualdean) eta beste 23 RTX domeinuan. Domeinu kontserbatuak direla esan daitekeen arren, egitura aldetik malguak izan ohi dira. Ondorioz, bioinformatikari esker aurresandako sekuentzia guztiek *in vivo* ez dute zertan kolesterola lotzeko gaitasunik izan behar (Brown *et al*., 2016). Bestalde, zenbaitetan kolesterolak bere 3D egitura moldatu dezake CRAC domeinuak ez diren beste gune batzuetara lotzeko. Honenbestez, CRAC algoritmoak proteinetan kolesterolari lotzen zaizkion motiboak aurresateko gaitasuna duen arren, zenbaitetan analisi bioinformatikoek huts egin izan dute (Fantini eta Barrantes, 2013).

3.2. ACTak kolesterola duten mintzekiko lehentasuna du

ACTak eta konposizio desberdinetako mintzek elkarrekintzarik ote duten aztertzeko, Z potentziala neurtu da. Teknika honek nanopartikulen gainazaleko kargaren balioespena egiteko balio du. Eremu elektrikoa aplikatzean kargatutako partikulek dagokien elektrodora migratuko dute, migrazio abiadura Z potentzialarekiko proportzionala izanik (Smith *et al*., 2017). Entsegu honetan, *Large Unilamellar Vesicles* (LUV) edo geruza bakarreko liposoma handiak erabili dira (Patil eta Jadhav, 2014). DOPC (*1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine*) eta DOPC:Chol (1:1, mol:mol) konposizioak erabili dira. **3A. Irudia**n adierazi bezala, konposizio hauetako LUVek gainazaleko karga positiboa dute. ACTak pH 8.0an karga neto negatiboa duenez, mintzaren gainazaletik gertu kokatuko balitz, Z potentzialaren balioa jaitsiko litzateke. **3B. Irudia**n behatu dezakegu, DOPC soilez osatutako LUVen kasuan, Z potentzialaren aldakortasuna txikia dela, eta hortaz, ACTarekin duten elkarrekintza ahula dela iradoki genezake. Aldiz, DOPC:Chol 1:1 konposizioko LUVen kasuan, ACT kontzentrazioa igo ahala Z potentziala era nabarmenean jaisten da. Hortaz, mintza eta ACTaren artean elkarrekintza dagoela pentsa genezake (**3. Irudia**).

3. Irudia. Z potentziala. (A) Oinarriak (Smith *et al*., 2017). **(B) ACT-LUV elkarrekintza**.



3.3. Kolesterol askeak ACTaren eta LUVen arteko elkarrekintza oztopatzen du

Ondorio esanguratsuagoak atera ahal izateko, kolesterol askeak ACTaren eta mintzen arteko elkarrekintza oztopatzen ote duen aztertu nahi izan da. Horretarako, solutu fluoreszenteen askapena neurtu da. **4A. Irudia**n adierazi bezala, ANTS molekula fluoreszentea eta bere amatatzailea den DPXa DOPC eta DOPC:Chol (1:1) liposomen barnean kapsulatu dira. ACTa

gehitzean besikulen mintza desegonkortu eta iragazkor bihurtuko litzateke, eta ondorioz, solutuak kanpo mediora askatuko lirateke. Ondorioz, ANTS eta DPX kanpo medioan diluitzean, fluoreszentzia seinalea emendatuko litzateke (Smolarsky *et al*., 1977) (**4A. Irudia)**. Entsegua burutu aurretik, etanoletan disolbaturik zegoen kolesterol askea ACTarekin inkubatu da. Soluzio honi LUVak gehitu eta fluoreszentzia seinalea jaso da 30 minutuz. Fluoreszentzia seinale maximoa zein den jakiteko detergentea gehitu da. Askapen portzentajeak kalkulatzeko **(1) Ekuazioa** erabili da:

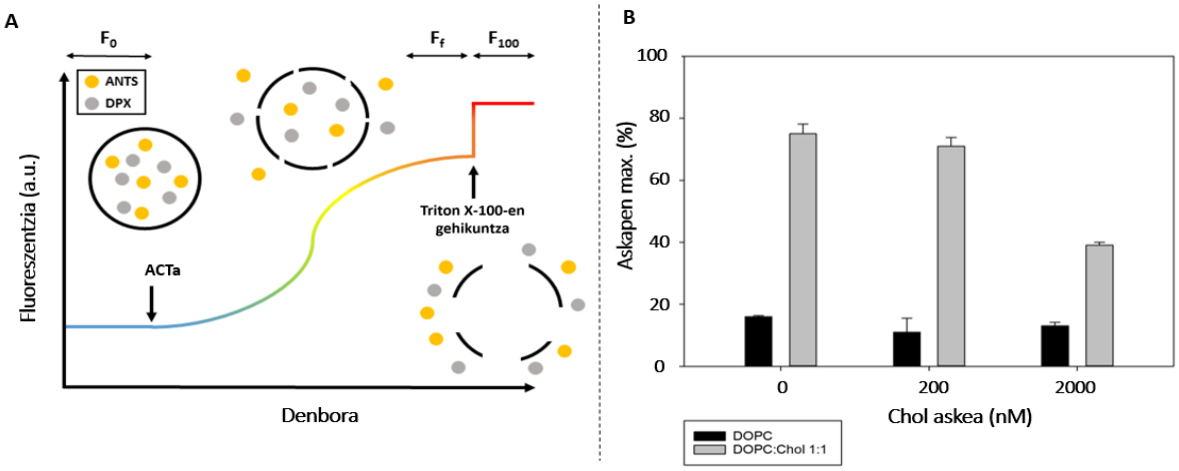
$$Askapena\ (\%) = \frac{(F_f - F_0)}{(F_{100} - F_0)} \times 100 \qquad (1)$$

ACT gehitu aurreko minutuaren fluoreszentzia basala (F_0).

- ACT gehitu osteko hurrengo 29 minutuen fluoreszentzia (F_f).
- Detergentea gehitu osteko azken minutuaren fluoreszentzia (F_{100}).

Askapen-zinetiken bidez (**4B. Irudia**), lehenik eta behin, Z potentzialeko esperimentuetan iradokitakoa berretsi dugu: ACT DOPC nahiz DOPC:Chol (1:1) konposizioko mintzak iragazkor bihurtzeko gai da. Hala ere, DOPCz osaturiko mintzetan askapena ez da % 20ra heltzen. Beraz, afinitate gutxiz lotzen dela ondorioztatu genezake. DOPC:Chol (1:1) konposizioko mintzetan, berriz, kolesterol askea gehitu ahala, askapen maximoaren jaitsiera nabarmena ikusten da. Badirudi liposomen mintzekin alderatuz gero, ACTak kolesterol askearekiko afinitate handiagoa erakusten duela.

4. Irudia. Askapen-zinetikak. (A) Oinarriak eta **(B) kolesterol askearen eragina.**



3.4. Kolesterolaren lotura inhibitzeak ACTak eragindako hemolisia murrizten du

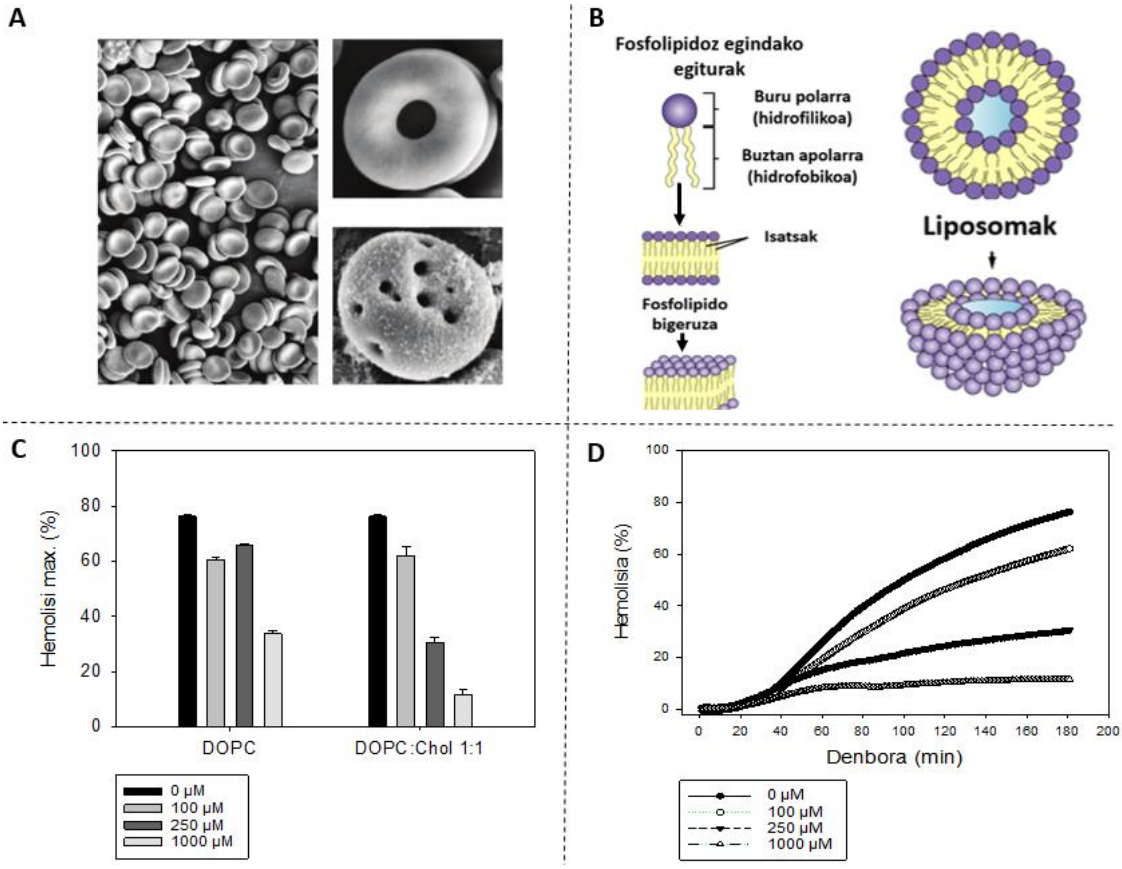
Kolesterolak ACTaren aktibitate poro-eragilean izan dezakeen eragina aztertzeko, Bellalou eta kideen lanetik moldatutako aktibitate hemolitikoaren protokoloa erabili da (Bellalou *et al*., 1990). Hemolisia denboran zehar neurtzeko, argi dispertsioan oinarritutako entsegu espektrofotometrikoa burutu da. Egoera onean dagoen eritrozito suspentsio batek bere tamaina eta formagatik, argia barreiatzen du, eta horrenbestez, uherra da. Baina, hemolisiak aurrera jarraitu ahala, eritrozitoak puskatuz joango dira eta laginak uhertasuna galduko du. Honela, ACTak eritrozitoetan eragiten duen uhertasunaren galera jarraitu eta toxinak eragindako lisi zelularrarekin erlazionatu daiteke (Louw eta Visser, 1977). Lehenago Brown eta kideek LtxArekin egin zuten bezala (Brown *et al*., 2016), guk ACTaren aktibitate poro eragilea inhibitu nahi izan dugu. Entsegu honetan, ACTa LUVekin inkubatu da, ondoren, eritrozito suspentsio bat gehitu eta hemolisi-zinetika burutu da. **(2) Ekuazioa** erabili da aparatuak neurtutako absorbantzia balioetatik hemolisi portzentajeak kalkulatzeko:

$$Hemolisia\ (\%) = \frac{(Abs_{700_{lagina}} - Abs_{700_{\%0}})}{(Abs_{700_{\%100}} - Abs_{700_{\%0}})} \times 100 \qquad (2)$$

5C. eta 5D. Irudiei erreparatuz gero, DOPC:Chol (1:1) LUVen kasuan, liposoma kontzentrazioa igo ahala hemolisi portzentajea nabarmen jaisten dela ikus dezakegu. Horrek,

hasiera batean egindako hurbilketa egokia dela baieztatzen du. Gainera, inhibizioa espezifikoa dela frogatzeko, soilik DOPCz osatutako LUVak erabili dira eta ACTaren aktibitatea inhibitzeko gaitasun txikiagoa erakutsi dute. Bi kasuetan hemolisi portzentaje maximoaren (%) jaitsiera behatu dugun arren, kolesterolaren presentzian jaitsiera hau askoz ere nabarmenagoa izan da. Beraz, kolesterola duten liposomak hemolisia inhibitzeko gai dira.

5. Irudia. ACTak eragindako hemolisi-zinetikak. (A) Eritrozitoen ekorketa bidezko mikrografia (2500x) (Mustafa et al., 2016). **(B) Liposomen irudikapen eskematikoa** (Mishra et al., 2011). **(C) Hemolisi-portzentaje maximoak. (D) DOPC:Chol (1:1) LUVekin egindako hemolisi-zinetikak.**



3. Ondorioak

Bilduriko emaitzei esker badakigu ACTak kolesterol proportzio altuak dituzten mintzekiko afinitate handia duela. Gainera, kanpotik kolesterol askea gehitzean, ACTak mintzak desegonkortzeko eta eritrozitoen hemolisia eragiteko daukan gaitasuna murrizten dela ikusi dugu. Hortaz, proteinak kolesterolarekiko duen afinitateak kolesterola ezagutu eta hari lotzen zaion sekuentziaren bat, gutxienez, izan dezakela pentsarazten digu eta hare gehiago, gutxienez bat linker eskualdean kokatuta egon litekela uste dugu.

4. Etorkizunerako planteatzen den norabidea

Etorkizunera begira, motibo hauek toxina eta mintzaren arteko elkarrekintzan duten garrantzia ikertu nahi da. Alde batetik, eredu errealistago bat eraiki nahian, ikerketa honetan frogatutako emaitzak J774A-1 makrofago lerro-zelularretan betetzen ote diren egiaztatzen ari gara. Izan ere, liposomek ez dute mintz potentzialik eta beraz, ez dute ACTa eta zelula-mintzaren arteko elkarrekintza zehatz mehatz erreproduzitzen (Masin *et al*., 2004). Bestetik, bibliografian deskribatutako mintzaren eta linker eskualdearen arteko elkarrekintza CRAC motibo bidez gertatzen dela ziurtatu nahi dugu eta motibo hori/horiek zehazki zein den/diren identifikatu. Izan ere, linker eskualdearen zati esanguratsu bat mintzeko lipidoekin elkarrekintzak izateko gai dela deskribatu da (Masin *et al*., 2016). Gainera, eskualde honen parte den peptido batek (454-484 hondarrak) mintzetan txertatzeko eta horiek desegonkortzeko gaitasuna daukala frogatu dute (Voegele *et al*., 2017). Bilaketa bioinformatikoetan oinarrituz, behinik behin, 413-420 eta 481-487 hondarrak CRAC motibo posibleak izan daitezkeela jakin

dugu. Horregatik, 20 aminoazido inguruz osatutako ACTaren zenbait peptido eskuratu ditugu (400-600 hondarren bitartekoak) eta mintzeko kolesterolarekin elkarrekintzarik ote duten aztertzen ari gara. Bestalde, CRAC sekuentzia posibleak eraldatuta dauzkaten ACTaren mutanteak purifikatu ditugu eta horien aktibitate katalitiko eta poro-eragileak aztertzen ari gara. Bukatzeko, ACTaren segmentu bakoitzari dagozkion aktibitate eta funtzioak esleitu nahi dizkiogu, AC domeinuaren mintzean zeharreko translokazioa urratsez urrats karakterizatu ahal izateko.

5. Erreferentziak

Amuategi, J., Benito-Vicente, A., Uribe, K.B., Martín, C. eta Ostolaza, H. (2020), Kukutxeztula: "gainditutako" gaitz baten itzulera, *EKAIA. EHUko Zientzia eta Teknologia aldizkaria*. https://doi.org/10.1387/ekaia.21789

Bellalou, J., Sakamoto, H., Ladant, D., Geoffroy, C., & Ullmann, A. (1990), Deletions affecting hemolytic and toxin activities of *Bordetella pertussis* adenylate cyclase. *Infection and Immunity*, 58(10), 3242–3247. https://iai.asm.org/content/58/10/3242/figures-only

Hanski, E. eta Farfel, Z. (1985), *Bordetella pertussis* invasive adenylate cyclase. Partial resolution and properties of its cellular penetration. *Journal of Biological Chemistry*, 10;260(9):5526-32. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2859287/

Brown, A.C., Koufos, E., Balashova, N. V., Boesze-Battaglia, K., eta Lally, E. T. (2016), Inhibition of LtxA toxicity by blocking cholesterol binding with peptides. *Molecular Oral Microbiology*, 31(1), 94–105. https://doi.org/10.1111/omi.12133

Brown, A. C., Balashova, N. V., Epand, R. M., Epand, R. F., Bragin, A., Kachlany, S. C., Walters, M. J., Du, Y., Boesze-Battaglia, K., eta Lally, E. T. (2013), *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* Leukotoxin Utilizes a Cholesterol Recognition/Amino Acid Consensus Site for Membrane Association. *Journal of Biological Chemistry*, 288(32), 23607–23621. https://doi.org/10.1074/jbc.M113.486654

Chenal, A. (2018), An Introduction to the Toxins Special Issue on the Adenylate Cyclase Toxin. *Toxins*, 10(10), 386. https://doi.org/10.3390/toxins10100386

Eby, J. C., Hoffman, C. L., Gonyar, L. A., eta Hewlett, E. L. (2015), Review of the neutrophil response to *Bordetella pertussis* infection. In Pathogens and Disease 73(9). Oxford University Press. https://doi.org/10.1093/femspd/ftv081

Epand, R. F., Thomas, A., Brasseur, R., Vishwanathan, S. A., Hunter, E., eta Epand, R. M. (2006), Juxtamembrane protein segments that contribute to recruitment of cholesterol into domains. *Biochemistry*, 45(19), 6105–6114. https://doi.org/10.1021/bi060245+

Fantini, J., eta Barrantes, F. J. (2013), How cholesterol interacts with membrane proteins: an exploration of cholesterol-binding sites including CRAC, CARC, and tilted domains. *Frontiers in Physiology*, 4, 31. https://doi.org/10.3389/fphys.2013.00031

Fantini, J., Di Scala, C., Evans, L. S., Williamson, P. T. F., eta Barrantes, F. J. (2016), A mirror code for protein-cholesterol interactions in the two leaflets of biological membranes. *Scientific Reports*, 6(1), 1–14. https://doi.org/10.1038/srep21907

Fradin, C., Satsoura, D., eta Andrews, D. W. (2009), Punching Holes in Membranes: How Oligomeric Pore-Forming Proteins and Lipids Cooperate to Form Aqueous Channels in Membranes. *Biomembrane Frontiers* (pp. 223–262). https://doi.org/10.1007/978-1-60761-314-5_9

González-Bullón, D., B. Uribe, K., Largo, E., Guembelzu, G., García-Arribas, A. B., Martín, C., eta Ostolaza, H. (2019), Membrane Permeabilization by *Bordetella* Adenylate Cyclase Toxin Involves Pores of Tunable Size. *Biomolecules*, 9(5), 183. https://doi.org/10.3390/biom9050183

Kilgore, P. E., Salim, A. M., Zervos, M. J., eta Schmitt, H.-J. (2016), Pertussis: Microbiology, Disease, Treatment, and Prevention. *Clinical Microbiology Reviews*, 29(3), 449–486. https://doi.org/10.1128/CMR.00083-15

Ladant, D., eta Ullmann, A. (1999), *Bordetella pertussis* adenylate cyclase: A toxin with multiple talents. *In Trends in Microbiology* 7 (4), 172–176. https://doi.org/10.1016/S0966-842X(99)01468-7

Lakowicz, J. R. (2006): *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. Springer, USA. https://doi.org/10.1007/978-0-387-46312-4

Linhartová, I., Bumba, L., Mašn, J., Basler, M., Osička, R., Kamanová, J., Procházková, K., Adkins, I., Hejnová-Holubová, J., Sadílková, L., Morová, J., eta Šebo, P. (2010), RTX proteins: A highly diverse family secreted bya common mechanism. *FEMS Microbiology Reviews* (34 (6), 1076–1112. https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2010.00231.x

Louw, A. I., eta Visser, L. (1977), Kinetics of erythrocyte lysis by snake venom cardiotoxins. *Biochimica et Biophysica Acta-General Subjects*, 498(1), 143–153. https://doi.org/10.1016/0304-4165(77)90095-2

Martin, C., Requero, M.-A., Masin, J., Konopasek, I., Goni, F. M., Sebo, P., eta Ostolaza, H. (2004), Membrane Restructuring by *Bordetella pertussis* Adenylate Cyclase Toxin, a Member of the RTX Toxin Family. *Journal of Bacteriology*, 186(12), 3760–3765. https://doi.org/10.1128/JB.186.12.3760-3765.2004

Masin, J., Konopásek, I., Svobodová, J., eta Sebo, P. (2004), Different structural requirements for adenylate cyclase toxin interactions with erythrocyte and liposome membranes. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1660(1–2), 144–154. https://europepmc.org/abstract/med/14757230

Masin, J., Osickova, A., Sukova, A., Fiser, R., Halada, P., Bumba, L., Linhartova, I., Osicka, R., eta Sebo, P. (2016), Negatively charged residues of the segment linking the enzyme and cytolysin moieties restrict the membrane-permeabilizing capacity of adenylate cyclase toxin. *Scientific Reports*, 6(1), 29137. https://doi.org/10.1038/srep29137

Mustafa, I., Al Marwani, A., Mamdouh Nasr, K., Abdulla Kano, N., eta Hadwan, T. (2016), Time Dependent Assessment of Morphological Changes: Leukodepleted Packed Red Blood Cells Stored in SAGM. *BioMed Research International*, 2016, 1–7. https://doi.org/10.1155/2016/4529434

Patil, Y. P., eta Jadhav, S. (2014), Novel methods for liposome preparation. *Chemistry and Physics of Lipids*, 177, 8–18. https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2013.10.011

Rogel, A., eta Hanski, E. (1992), Distinct steps in the penetration of adenylate cyclase toxin of *Bordetella pertussis* into sheep erythrocytes. Translocation of the toxin across the membrane. *Journal of Biological Chemistry*, 267(31), 22599–22605.

Smith, M. C., Crist, R. M., Clogston, J. D., eta McNeil, S. E. (2017), Zeta potential: a case study of cationic, anionic, and neutral liposomes. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 409(24), 5779–5787. https://doi.org/10.1007/s00216-017-0527-z

Smolarsky, M., Teitelbaum, D., Sela, M., eta Gitler, C. (1977), A simple fluorescent method to determine complement-mediated liposome immune lysis. *Journal of Immunological Methods*, 15(3), 255–265. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/323363

Subrini, O., Sotomayor-Pérez, A.-C., Hessel, A., Spiaczka-Karst, J., Selwa, E., Sapay, N., Veneziano, R., Pansieri, J., Chopineau, J., Ladant, D., eta Chenal, A. (2013), Characterization of a Membrane-active Peptide from the *Bordetella pertussis* CyaA Toxin. *Journal of Biological Chemistry*, 288(45), 32585–32598. https://doi.org/10.1074/jbc.M113.508838

Voegele, A., Subrini, O., Sapay, N., Ladant, D., eta Chenal, A. (2017), Membrane-Active Properties of an Amphitropic Peptide from the CyaA Toxin Translocation Region. *Toxins*, 9(11), 369. https://doi.org/10.3390/toxins9110369

Yan, K., Gao, L. N., Cui, Y. L., Zhang, Y., eta Zhou, X. (2016), The cyclic AMP signaling pathway: Exploring targets for successful drug discovery. *Molecular Medicine Reports*, 13(5), 3715–3723. https://doi.org/10.3892/mmr.2016.5005

6. Eskerrak eta oharrak

Artikulu hau Jone Amuategiri esleitutako UPV/EHUren Doktorego Tesirako beka bati esker eta Helena Ostolazak jasotako Espainiako Ekonomia eta Lehiakortasun Ministerioko (BFU2017-82758-P (AEI/FEDER, UE) eta Eusko Jaurlaritzako (Grupos Consolidados IT1264-19) diru-laguntzei esker idatzi da. Eskerrak eman nahi dizkiot David González Bullóni teknika esperimental guztiak irakasteagatik; Rocío Alonsori proteinen purifikazioan eskainitako ezinbesteko laguntzagatik; Helena Ostolaza Etxaberi, ideia planteatu eta zuzentzeagatik; Euskal Herriko Unibertsitateari eta Biofisika Institutuari esperimentuak egiteko beharrezko baliabideak eskaintzeagatik.

Ikusezina ikusgai bihurtzearen erronka: analisi bideratutik ez-bideratura jauzia bereizmen altuko masa espektrometriari esker

Musatadi, M.[1,2], Olivares, M. [1,2], Prieto, A.[1,2] eta Zuloaga, O.[1,2]
Kimika Analitikoa Saila (UPV/EHU)[1], Plentziako Itsas Estazioa (PIE-UPV/EHU)[2]
mikel.musatadi@ehu.eus

Laburpena

Konposatu organikoek gure eguneroko bizitzan ezinbesteko garrantzia izan arren, horiekiko daukagun esposizioa kezkagarria da. Izan ere, euretariko asko kaltegarriak izan daitezke bai gizakiontzat zein ingurumenarentzat. Kimika analitikoaren ikuspuntutik, beharrezkoa da ahalik eta konposatu gehien detektatzeko metodoen garapena; hots, analisi bideratutik susmagarrien analisira eta analisi ez-bideratura igarotzea. Erronka horri aurre egin nahian, lan honetan hainbat matrizerako (giza-zein animalia-esnea eta arrain-muskulua) garatutako metodo analitikoak laburbiltzen dira, bereizmen altuko masa espektrometrian (HRMSan) oinarrituta. Susmagarrien analisiari esker, askotan jarraitzen ez diren konposatu organiko anitz identifikatzea posible izan da matrize bakoitzean.

Hitz gakoak: konposatu organiko, esposizioa, susmagarrien analisia, analisi ez-bideratua, HRMS

Abstract

Although organic compounds are extremely important in our daily lives, the level of exposure that we have towards them is concerning, as they may pose a serious threat to humans and environment. From an analytical chemistry point of view, the development of methods for the detection of as many compounds as possible is mandatory. That means that the transition from target analysis to suspect screening or non-target analysis is needed. To overcome this challenge, different methods based on high resolution mass spectrometry (HRMS) to detect organic compounds in several matrices (human and animal origin milk and fish muscle) are described in the present work. The performed suspect analysis enabled identifying a wide variety of non-monitored compounds in each matrix.

Keywords: organic compounds, exposure, suspect screening, non-target analysis, HRMS.

1. Sarrera eta motibazioa

Azken urteotan, ustekabeko gaixotasunen eta gaitzen igoerek, ingurumeneko kutsatzaileen aurreko esposizioaren inguruko kezka sortu dute. Ildo horretatik, esposoma kontzeptua garatu da, gizakiok bizitzan zehar kutsatzaile kimikoekiko izan ditzakegun esposizio guztiak jaso eta ulertu nahian (Wild, 2005). Halaber, ikerketek erakutsi dutenez, arlo genetikoak ezin dezake minbizia, diabetesa edota gaixotasun kardiobaskularrak bezalako gaitz konplexuen oinarria osotasunean azaldu, beharrezkoa da esposoma ezagutzea (Cui Yuxia et al., 2016).

Konposatu kimikoekiko esposizioa kezkagarria baldin bada ere, substantzia edota espezie kimiko gutxi batzuk bakarrik daude debekatuta, araututa edo jarraipen-zerrendetan presente. Nagusiki, metal astunak eta konposatu organiko klasikoak (bifenilo polikloratuak, hidrokarburo aromatiko poliziklikoak, furanoak edota dioxinak) dira, haien kalteak sakon ikertuak eta ezagunak baitira (Stefanidou et al., 2009). Hala ere, konposatu organikoen espektroa oso zabala da, eta euren erabilera zeharo hedatua dago gaur egun. Izan ere, ezinbestekoak dira gure eguneroko bizitzan, edonon aurki ditzakegularik; hala nola, kosmetikoetan, ultramore iragazkietan, farmakoetan, plagizidetan, plastikoetan, zein itsaspenaren aurkako bezalako produktu industrialetan eta abar (Tousova et al., 2017).

Konposatu horien toxikotasunaren inguruko ezagutza urria den arren, beraiekiko daukagun etengabeko esposizioak eta erregulazio ezak arreta berezia bereganatzea eragin dute. Hori dela eta, kutsatzaile emergente bezala izendatu dira (Čelić et al., 2017), eta mundu mailan garrantzia handikoak diren erakundeek haien jarraipen zerrendetan sartu dituzte, adibidez, Estatu Batuetako Ingurumena Babesteko Agentziak[1] (US EPA, *United States Environmental Protection Agency)*, Europako Uraren Zuzentarauak[2] (*European Water Framework Directive*) edota

[1] https://www.epa.gov/
[2] https://ec.europa.eu/environment/water/water-framework/info/intro_en.htm

NORMAN sarea[3] delakoak. Halaber, konposatu hauen metabolitoek eta eraldaketa-produktuek kezka areagotzea eragin dute. Izan ere, konposatu baten eraldaketa-produktu jakin bat jatorrizko espeziea baino toxikoagoa izan daiteke, kremetan aurkitzea ohikoa den oxibentzonaren kasuan gertatzen bezala, adibidez (Kunisue et al., 2012).

Gizakiok konposatu kimikoak erraz barnera ditzakegu arnasaren, ahoaren edota azalaren bidez (Nickerson, 2006). Gorputzean, hainbat jariakinetan eta ehunetan meta daitezke, molekularen propietate fisiko-kimikoen eta farmako-zinetikoen arabera. Halaber, ohikoa da kutsatzaile horiek metabolizatzea eta, gero, gernuaren bidez kanporatzea (Adenuga et al., 2020). Hala ere, odolera ere igaro daitezke, eta bertatik, gorputz osoan zehar hedatu. Zenbait konposatu organiko bular-esnera hel daitezke, eta hortik kanporatu bularra ematerakoan (Garwolińska et al., 2019). Ondorioz, bular-esnean egon daitezkeen konposatu organikoen jarraipena azken urteetako erronka izan da, ez bakarrik kutsatzaileekiko jaioberrien esposizio-iturri nagusia izateagatik, baizik eta bular minbiziaren arrazoi garrantzitsu bat delako ere (Siddique et al., 2016).

Ildo beretik, bestelako esne laginak ere analizatu dira, batez ere, animalia jatorria dutenak. Izan ere, esnekiak gizakion dietaren osagai garrantzitsuenetarikoak dira eta, eskari handi horri erantzuteko, nekazaritzan zein abeltzaintzan erabiltzen den konposatu kimikoen koktela izugarria da (Jadhav et al., 2019). Gainera, azken urteotan legez kanpoko pestizidek eta sendagaiek gora egin dute, nahiz eta hainbat erregulazio-protokolo egon (Beyene, 2015).

Halaber, izaki itsastarrek ere gero eta arreta handiagoa bereganatu dute, gure gizartean oso hedatua baitago haien kontsumoa. Ikusi dugunez, kutsatzaile organikoak ingurumenera erraz hel daitezke aipaturiko erabilera hedatuaren ondorioz, baina, bestelako iturriak ere badaude; adibidez, araztegiak. Azken horien kasuan, ohiko ezabatze-prozesuak ez dira gai konposatu organiko txikiak eliminatzeko (McArdell et al., 2003). Gainera, kutsatzaile horien iraunkortasun erlatiboa dela eta, luzaroan egon daitezke ingurumenean, bertako biota kutsatuz eta kaltetuz (Mijangos et al., 2018). Are gehiago, ikerketek erakutsi dute konposatu organikoak itsaskietan bio-akumulatzeko eta bio-kontzentratzeko joera daukatela (Arnot & Gobas, 2006).

Esposomaren auzi honetan, non milaka konposatu dauden, beharrezkoa da metodo analitikoak garatzea konposatu organiko anitz aldi berean determinatzeko. Horrela, kutsatzaile organikoen, eta, zehazki, kutsatzaile emergenteen inguruko informazioa areagotu daiteke, erregulazio- eta jarraipen-zerrendak osatuz, eta esposomaren inguruko zalantzak argituz.

2. Arloko egoera eta ikerketaren helburuak

Analisi bideratuan, laginean aldez aurretik ezagunak diren konposatuak determinatzen dira, euren estandar puruak eskuratu ostean. Hala ere, aipatutako esposomaren inguruko informazioa lortu nahi denean, hots, laginean dauden ahalik eta konposatu gehien analizatu nahi direnean, beharrezkoa da analisi ez-bideratua (Milman & Zhurkovich, 2017). Hala ere, analisi guztiz ez-bideratua errealitatetik urruntzen den hurbilketa da eta, horren ordez, susmagarrien analisia deritzona egiten da. Kasu horretan, analisi bideratuko ehunka konposatuko zerrendak milaka konposatu susmagarri dituzten zerrendetara handitzen dira. Hala ere, analito zerrenda horren handia denean, ez da ekonomikoki bideragarria konposatu guztien estandarrak eskuratzea, konposatuak identifikatzeko bestelako estrategia bat bilatzea beharrezkoa izanik (Hernández et al., 2012).

Azken urteotan, bereizmen altuko masa espektrometriak (HRMSak) bultzada itzela izan du susmagarrien analisia aurrera eramateko informazioa eskaintzen duelako (Menger et al., 2021). Izan ere, laginean dauden molekulen egituren inguruko informazio aberatsa lortzen da, batez ere, tandem eran lan eginez (HRMS/MS). Lan moldaketa horretan, konposatu bakoitzaren lehen masa espektroa (MS1, ioi pseudomolekularra eta profil isotopikoa) eta bigarren masa espektroa (MS2, ioi psedomolekularraren apurketak) bereizmen altuan lortzen dira eta, horri esker, posible da estandarrak erabili gabe susmagarriak identifikatzea (Andra et al., 2017). Horretarako, susmagarrien formula molekularra eta masa zehatza biltzen dituzten zerrendak erabiltzen dira MS1 espektroa konfirmatzeko. MS2 espektroa konfirmatzeko, ordea, datu-baseak edota *in-silico*

[3] https://www.norman-network.net/

fragmentazioa erabiltzea ohikoa da. Behin susmagarriak identifikatuta, estandarrak eskuratu daitezke identifikatu diren konposatuen erabateko konfirmazioa egiteko (Gago-Ferrero et al., 2016).

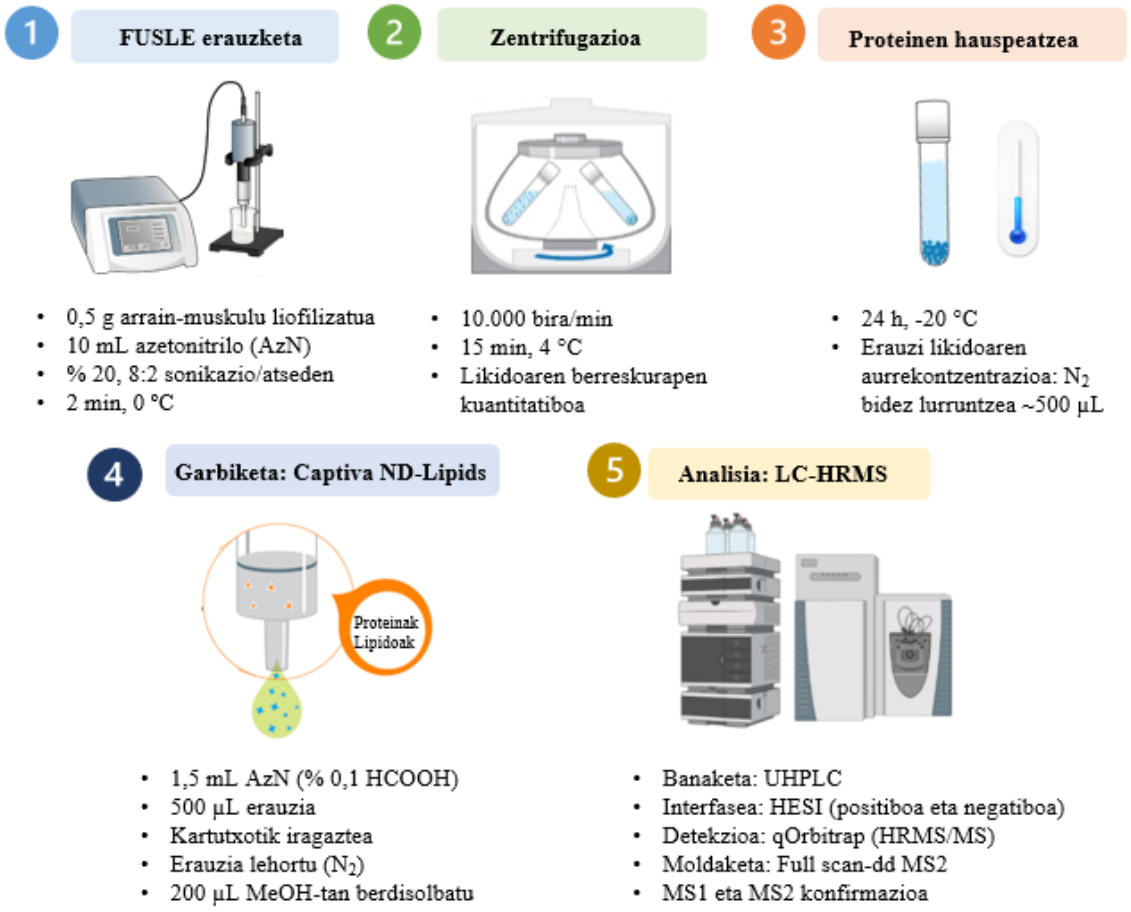
Susmagarrien analisiko prozedura analitikoen inguruan, beharrezkoa da diskriminazio-maila oso txikia izatea, helburua ahalik eta konposatu gehien detektatzea delako. Hala ere, gomendagarria da garbiketa-urratsak sartzea detekzioan egon daitekeen matrize-efektua minimizatzeko. Analisia dela eta, lehenik konposatuen banaketa egiten da teknika kromatografikoak (likido- zein gas-kromatografia; LC eta GC, hurrenez hurren) erabilita, eta ostean, HRMS bidezko detekzioa (Baduel et al., 2015).

Susmagarrien analisia eta analisi ez-bideratua, gaur egun, kimika analitikoan dauden erronka nagusienetarikoak dira. Horregatik, lan honetan, arrain-muskuluan eta esne laginetan (giza- eta animalia-esnea eta esne-hautsa) metatutako konposatu organikoen analisi bideratuez gain, susmagarrien analisiak ere laburbiltzen dira LC-HRMS/MS erabilita. Helburu nagusi hori aurrera eramateko, matrize bakoitzerako metodo analitikoa optimizatu eta berretsi da.

3. Ikerketaren muina

3.1. Konposatu organikoen analisi bideratua eta susmagarrien analisia arrain-muskuluan LC-HRMS/MS bidez

Konposatu organikoak arrain-muskuluan determinatzeko prozedura analitiko optimoa 1. irudian laburbildu da.



1. irudia. Konposatu organikoak arrain-muskuluan determinatzeko prozedura analitikoa

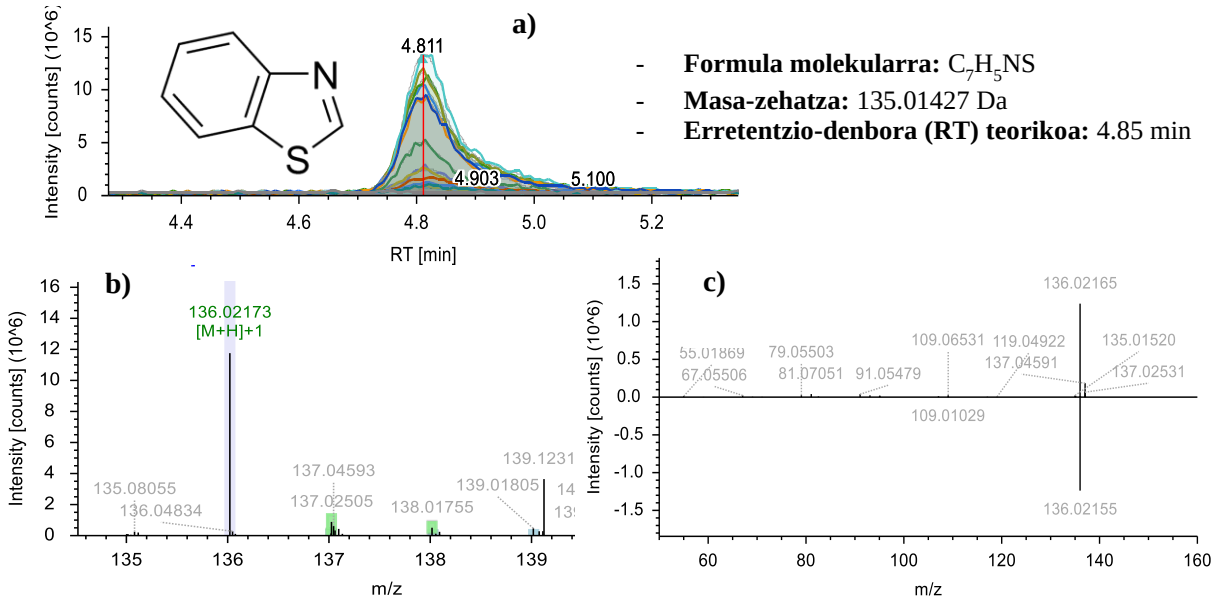
Arrain-xerrak birrindu, homogeneizatu eta liofilizatu ostean, konposatuen erauzketa ultrasoinu fokatu (FUSLE, *focused ultrasound solid-liquid extraction*) bidez egin zen. FUSLEren selektibitate ezaren ondorioz, arrain-muskuluko lipidoak eta proteinak erauzi ziren konposatu organikoekin batera. Horiek baztertzeko, erauzi likidoa zentrifugatu, tenperatura

baxuan gorde, eta Captiva ND-Lipids delako iragazki bidezko garbiketa eraman zen aurrera. Azkenik, konposatuen banaketa LC erabilita eta identifikazioa kuadrupolo-Orbitrap (qOrbitrap, Q Exactive Focus, Thermo Fisher Scientific) masa-analizatzaile hibridoaren bidez egin zen *Full scan - data dependent (dd) MS2* moldaketan ionizazio positibo zein negatiboan. Horrela, konposatu bakoitzaren MS1 eta MS2 espektroak bereizmen altuan eskuratu ziren. Lan honen xehetasun gehiagorako, ikus Musatadi et al. (2020) argitalpena. Lan horretan bertan analisi bideratuan erabilitako analitoen zerrenda aurki ere daiteke.

Metodo analitikoa hiru kontzentrazio-mailetan (20, 100 eta 200 ng/g) berretsi zen emaitza egokiak lortuz, eta hainbat arrain mota analizatu ziren kutsatzaile organikoak determinatzeko helburuarekin, hain zuzen ere, lupia (*Dicentrarchus labrax*), urraburua (*Sparus aurata*) legatza (*Merluccius australis*), otarrainxka (*Penaeus sp.*) eta hondoetako korrokoia (*Chelon labrosus*). Analisi bideratuaren bidez erabilera anitzeko 200 kutsatzaile organiko bilatu ziren, eta susmagarrien analisi bidez, ordea, analito zerrenda kutsatzaileak izan daitezkeen 8.000 inguru konposatu susmagarrira hedatu zen.

Emaitzak direla eta, analisi bideratuaren bidez zenbait konposatu kuantifikatzea lortu zen laginetan. Horretarako, 200 kutsatzaileen estandar puruak analizatu eta MS1 eta MS2 bidezko konfirmazioa egin zen. Kuantifikatu ziren konposatuen artean, 2-hidroxibentzotiazola (polimeroen prestaketarako eta bakterio kultiboetako osagaia), bentzotiazola (katalizatzailea gomen fabrikazioan, korrosio inhibitzailea eta biozida), albendazola (botika antihelmintikoa) edota azido perfluorooktanosulfonikoa (PFOS, itsaspenaren aurkako kimikoa) aipa daitezke.

Susmagarrien analisi bidez, ordea, analisi bideratuko zerrendan ez zeuden beste hainbat konposatu identifikatzea lortu zen. Horretarako, MS1etik susmagarrien formula molekularra atera ostean, MS2 esperimentalak *mzCloud* (Thermo Fisher) liburutegian biltzen diren teorikoekin erkatu ziren. Konposatu baten identifikazioa ontzat emateko, masa zehatz esperimentalaren eta teorikoaren arteko diferentzia 5 ppm baino txikiagoa izan behar da, eta MS2 espektro esperimentalak eta *mzCloud* liburutegikoak % 70ean bat egin behar dute. Erretentzio-denborari dagokionez, esperimentala *Retention Time Indices*[4] plataformaren bidez simulatutakoaren konfiantza-tartean egon behar du estandar purua ez dugunean, eta ± 0.1 minutuko tartean estandar purua dugunean. Identifikatutako konposatu aipagarrienen artean, kaprolaktama (nylonaren sintesian erabilia), ftalatoak (plastikoen osagaiak), alkilfenolak (herbizidak edota plastikoen osagaiak), 2-naftilaminaren deribatuak (koloratzaileen sintesian erabiliak zein kautxuaren gehigarri antioxidatzaileak) edota pisu desberdineko polietilen glikolak (erabilera anitz industrian) daude. Adibide gisa, bentzotiazolaren emaitzak 2. irudian erakusten dira.



2. irudia. Bentzotiazolaren LC-HRMS/MS emaitzak: a) egitura, seinale kromatografikoa eta informazio fisiko-kimikoa, b) MS1 espektroa eta c) MS2 espektro esperimentala (goian) eta teorikoa (behean).

[4] http://rti.chem.uoa.gr/

3.2. Konposatu organikoen analisi bideratua eta susmagarrien analisia esnetan LC-HRMS/MS bidez

Analisia egiteko baldintza optimoen arabera, -20 ºC-an gordetako esne-laginak giro tenperaturara eraman ostean, 1 mL esneri 3 mL azetonitrilo gehitu zitzaizkion erauzketa burutzeko. Erauzketaren eraginkortasuna hobetzeko, sodio sulfato anhidroaren 0,5 g eta sodio kloruroaren 0,1 g gehitu ziren, eta nahastea minutu batez irabiatu zen potentzia maximoan zurrunbilo nahasgailuaren laguntzaz. Prozeduraren jarraipena, 1. irudiko 2, 3, eta 4 urratsen baliokidea da, hain zuzen, erauzia zentrifugatu, hotsean gorde eta garbiketa gehigarria Captiva ND-Lipids bidez egin zen matrize-efektua minimizatzeko. Azkenik, analisiak ere 1. irudiko 5. urratsean laburbildutako baldintzetan egin ziren LC-HRMS/MS bitartez. Lan honen zehaztasun guztiak ere Musatadi et al. (2021) artikuluan aurki daitezke.

Metodo analitiko optimoa bi kontzentrazio-mailatan (10 eta 40 ng/g) berretsi zen ingurumeneko ohiko kutsatzaileak diren 245 konposaturako analisi bideratua eginez. Horretarako, lehenik konposatu horien estandar puruak analizatu ziren. Analisi bideratuko metodoa susmagarrien analisira ere hedatu zen 17.800 inguruko zerrenda bat erabiliz, eta hainbat esne-lagin analizatu ziren konposatu organikoak detektatzeko helburuarekin. Aztertutako laginak direla eta, esne komertzialak (behi esne tratatua, tratatu gabea eta esne-hautsa) eta giza-esneak (borondatezko 4 emaile osasuntsu) erabili ziren. Giza-laginen manipulazioa Euskal Herriko Unibertsitateko etika batzordeko (HIEB-UPV/EHU, 2014/2/17ko 32. EHAA) protokoloak jarraituz egin zen, oniritzia jaso ostean (M10_2020_230 proiektua).

Analisi bideratuaren bidez, parazetamola (hanturaren kontrako sendagaia) eta ftalato bat determinatu ziren behi esnean. Esne hautsean ordea, bentzotiazola, kafeina (estimulatzailea), genisteina, genistina eta glizitina (fitoestrogenoak) eta 2-etilhexil-4,4-dimetilaminobentzoatoa (ultramore iragazkia) detektatu ziren. Ama-esneetan determinatutako konposatuak, ordea, bentzofenona (ultramore iragazkia), bentzotiazola, kafeina, kaprolaktama, ftalatoak, 2-etilhexil-4,4-dimetilaminobentzoatoa, orlistat (pisua galtzeko sendagaia) eta trietil fosfatoa (katalizatzaile industriala) izan ziren.

Susmagarrien analisiari esker, aurretiaz aipatutako konposatuez gain beste hainbat konposatu identifikatzea posible izan zen. Esne komertzialetan ohikoa izan zen 4-indolkarbaldehidoa (landare metabolitoa), bis(2-etilhexil) amina (surfaktantea), isokinolina (alkaloidea) edo sakarina (gozagarri artifiziala) aurkitzea. Giza-esne laginetan ordea, azido 2-(8-hidroxi-4a,8-dimetildekahidro-2-naftalenil) akrilikoa (terpenoa), 2,5-di-tert-butilhidrokinona (kimiko industriala), 4-indolkarbaldehidoa, butil metoxidibentzoilmetanoa (ultramore iragazkia), piperina (alkaloidea), sakarina edota metoxibentzenoa (landare osagaia) identifikatu ziren.

4. Ondorioak

Kontuan izanda gure eguneroko bizitzan erabiltzen dugun produktu kimikoen kantitatea izugarria dela, bai ingurumenean zein gure gorputzean metatuta aurki daitezkeen konposatuen zerrenda amaigabea da. Hortaz, lagin konkretu batean egon daitezkeen konposatu kimikoak determinatzeko, analisi bideratu klasikotik susmagarrien analisira eta analisi ez-bideratura jauzia ematea beharrezkoa dela ikusi da. Horretarako, laborategian aurrera eraman beharreko prozedura analitikoak ahalik eta diskriminazio txikienekoak izan behar dira, konposatu guztiak detektatu nahi direlako. Analisi urratsari dagokionez, HRMS ezinbesteko erreminta dela ikusi da lagineko konposatuen zerrenda oso luzea (susmagarrien analisia) denean eta guztien estandarrak aldez aurretik eskuratzea bideragarria ez denean. Halaber, arrain-muskuluan eta esne-lagin desberdinetan detektatutako konposatuak behatuz, kutsatzaile klasikoetan baino, kutsatzaile emergenteetan sakondu behar dela ondorioztatu da, lehen multzokoak zorrozki erregulatuta edota debekatuta daudelako, baina emergenteak ordea, ez.

5. Etorkizunerako planteatzen den norabidea

Lan honetatik abiatuta etorkizunerako planteatzen den erronka nagusia susmagarrien analisia eta analisi ez-bideratua sakonki ikertzea da HRMS erabilita. Batez ere, helburu garrantzitsua analisi mota hauen gaur egungo lan-fluxu luze eta neketsuak sinplifikatzea da. Monitorizatu nahi diren laginen artean, interesgarriak dira giza-gernua eta odola. Alde batetik, gernua da gizakiok konposatu kimikoak kanporatzeko daukagun bide nagusia. Bestetik, odola da gure gorputzeko jariakin garrantzitsuena, konposatu kimikoak gorputz osoan zehar barreiatzeko gai izanik. Horregatik, gernuan zein odolean dauden konposatu kimikoak identifikatuz, esposomaren auziko inguruko galderen erantzunak bila daitezke, horien artean aipagarriena genetikoki azaltzea posible ez diren gaixotasunen arrazoia izanik.

6. Erreferentziak

Adenuga, A. A., Ayinuola, O., Adejuyigbe, E. A., & Ogunfowokan, A. O. (2020). Biomonitoring of phthalate esters in breast-milk and urine samples as biomarkers for neonates' exposure, using modified quechers method with agricultural biochar as dispersive solid-phase extraction absorbent. *Microchemical Journal*, *152*, 104277. https://doi.org/10.1016/j.microc.2019.104277

Andra, S. S., Austin, C., Patel, D., Dolios, G., Awawda, M., & Arora, M. (2017). Trends in the application of high-resolution mass spectrometry for human biomonitoring: An analytical primer to studying the environmental chemical space of the human exposome. *Environment International*, *100*, 32-61. https://doi.org/10.1016/j.envint.2016.11.026

Arnot, J. A., & Gobas, F. A. (2006). A review of bioconcentration factor (BCF) and bioaccumulation factor (BAF) assessments for organic chemicals in aquatic organisms. *Environmental Reviews*, *14*(4), 257-297. https://doi.org/10.1139/a06-005

Baduel, C., Mueller, J. F., Tsai, H., & Gomez Ramos, M. J. (2015). Development of sample extraction and clean-up strategies for target and non-target analysis of environmental contaminants in biological matrices. *Journal of Chromatography A*, *1426*, 33-47. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2015.11.040

Beyene, T. (2015). Veterinary Drug Residues in Food-animal Products: Its Risk Factors and Potential Effects on Public Health. *Journal of Veterinary Science & Technology*, *07*(01). https://doi.org/10.4172/2157-7579.1000285

Čelić, M., Farré, M., Lopez de Alda, M., Perez, S., Barceló, D., & Petrović, M. (2017). Chapter 15 - Environmental analysis: Emerging pollutants. En S. Fanali, P. R. Haddad, C. F. Poole, & M.-L. Riekkola (Eds.), *Liquid Chromatography (Second Edition)* (pp. 451-477). Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-805392-8.00015-3

Cui Yuxia, Balshaw David M., Kwok Richard K., Thompson Claudia L., Collman Gwen W., & Birnbaum Linda S. (2016). The Exposome: Embracing the Complexity for Discovery in Environmental Health. *Environmental Health Perspectives*, *124*(8), A137-A140. https://doi.org/10.1289/EHP412

Gago-Ferrero, P., Schymanski, E. L., Hollender, J., & Thomaidis, N. S. (2016). Chapter 13—Nontarget Analysis of Environmental Samples Based on Liquid Chromatography Coupled to High Resolution Mass Spectrometry (LC-HRMS). En S. Pérez, P. Eichhorn, & D. Barceló (Eds.), *Comprehensive Analytical Chemistry* (Vol. 71, pp. 381-403). Elsevier. https://doi.org/10.1016/bs.coac.2016.01.012

Garwolińska, D., Namieśnik, J., Kot-Wasik, A., & Hewelt-Belka, W. (2019). State of the art in sample preparation for human breast milk metabolomics—Merits and limitations. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, *114*, 1-10. https://doi.org/10.1016/j.trac.2019.02.014

Hernández, F., Sancho, J. V., Ibáñez, M., Abad, E., Portolés, T., & Mattioli, L. (2012). Current use of high-resolution mass spectrometry in the environmental sciences. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, *403*(5), 1251-1264. https://doi.org/10.1007/s00216-012-5844-7

Jadhav, M. R., Pudale, A., Raut, P., Utture, S., Ahammed Shabeer, T. P., & Banerjee, K. (2019). A unified approach for high-throughput quantitative analysis of the residues of multi-class veterinary drugs and pesticides in bovine milk using LC-MS/MS and GC–MS/MS. *Food Chemistry*, *272*, 292-305. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.08.033

Kunisue, T., Chen, Z., Buck Louis, G. M., Sundaram, R., Hediger, M. L., Sun, L., & Kannan, K. (2012). Urinary Concentrations of Benzophenone-type UV Filters in U.S. Women and Their Association with Endometriosis. *Environmental Science & Technology*, *46*(8), 4624-4632. https://doi.org/10.1021/es204415a

McArdell, C. S., Molnar, E., Suter, M. J.-F., & Giger, W. (2003). Occurrence and Fate of Macrolide Antibiotics in Wastewater Treatment Plants and in the Glatt Valley Watershed, Switzerland. *Environmental Science & Technology*, *37*(24), 5479-5486. https://doi.org/10.1021/es034368i

Menger, F., Ahrens, L., Wiberg, K., & Gago-Ferrero, P. (2021). Suspect screening based on market data of polar halogenated micropollutants in river water affected by wastewater. *Journal of Hazardous Materials*, *401*, 123377. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.123377

Mijangos, L., Ziarrusta, H., Ros, O., Kortazar, L., Fernández, L. A., Olivares, M., Zuloaga, O., Prieto, A., & Etxebarria, N. (2018). Occurrence of emerging pollutants in estuaries of the Basque Country: Analysis of sources and distribution, and assessment of the environmental risk. *Water Research*, *147*, 152-163. https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.09.033

Milman, B. L., & Zhurkovich, I. K. (2017). The chemical space for non-target analysis. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, *97*, 179-187. https://doi.org/10.1016/j.trac.2017.09.013

Musatadi, M., González-Gaya, B., Irazola, M., Prieto, A., Etxebarria, N., Olivares, M., & Zuloaga, O. (2020). Focused ultrasound-based extraction for target analysis and suspect screening of organic xenobiotics in fish muscle. *Science of The Total Environment*, *740*, 139894. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.139894

Musatadi, Mikel, González-Gaya, B., Irazola, M., Prieto, A., Etxebarria, N., Olivares, M., & Zuloaga, O. (2021). Multi-Target Analysis and Suspect Screening of Xenobiotics in Milk by UHPLC-HRMS/MS. *Separations*, *8*(2), 14. https://doi.org/10.3390/separations8020014

Nickerson, K. (2006). Environmental Contaminants in Breast Milk. *Journal of Midwifery & Women's Health*, *51*(1), 26-34. https://doi.org/10.1016/j.jmwh.2005.09.006

Siddique, S., Kubwabo, C., & Harris, S. A. (2016). A review of the role of emerging environmental contaminants in the development of breast cancer in women. *Emerging Contaminants*, *2*(4), 204-219. https://doi.org/10.1016/j.emcon.2016.12.003

Stefanidou, M., Maravelias, C., & Spiliopoulou, C. (2009). Human Exposure to Endocrine Disruptors and Breast Milk. *Endocrine, Metabolic & Immune Disorders - Drug Targets*, *9*(3), 269-276. https://doi.org/10.2174/187153009789044374

Tousova, Z., Oswald, P., Slobodnik, J., Blaha, L., Muz, M., Hu, M., Brack, W., Krauss, M., Di Paolo, C., Tarcai, Z., Seiler, T.-B., Hollert, H., Koprivica, S., Ahel, M., Schollée, J. E., Hollender, J., Suter, M. J.-F., Hidasi, A. O., Schirmer, K., … Schulze, T. (2017). European demonstration program on the effect-based and chemical identification and monitoring of organic pollutants in European surface waters. *Science of The Total Environment*, *601-602*, 1849-1868. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.06.032

Wild, C. P. (2005). Complementing the Genome with an "Exposome": The Outstanding Challenge of Environmental Exposure Measurement in Molecular Epidemiology. *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers*, *14*(8), 1847-1850. https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-05-0456

7. Eskerrak eta oharrak

- Lan hau ondorengo aldizkari artikuluetatik eratorria da: "Musatadi, M., González-Gaya, B., Irazola, M., Prieto, A., Etxebarria, N., Olivares, M., & Zuloaga, O. (2020). Focused ultrasound-based extraction for target analysis and suspect screening of organic xenobiotics in fish muscle. *Science of The Total Environment*, *740*, 139894" eta "Musatadi, M., González-Gaya, B., Irazola, M., Prieto, A., Etxebarria, N., Olivares, M., & Zuloaga, O. (2021). Multi-Target Analysis and Suspect Screening of Xenobiotics in Milk by UHPLC-HRMS/MS. *Separations*, *8*(2), 14".

- Lan hau aurrera eramateko ezinbestekoa izan da Estatuko Ikerkuntza Agentziaren eta Eskualde Garapenerako Europako Funtsaren finantzazioa CTM2017-84763-C3-1-R eta CTM2017-90890-REDT proiektuen bitartez (Ekonomia, Industria eta Lehiakortasun Ministerioa), baita Eusko Jaurlaritzaren Hezkuntza Saileko Unibertsitate eta Ikerketa Sailordetzaren finantzazioa ikerketa talde kontsolidatu gisa (IT1213-19).

- Pertsonalki eskertzea gustatuko litzaidake Eusko Jaurlaritzaren Hezkuntza Saileko Ikasiker-lankidetza beka (A eredua, 2018/2019) eta doktoreak ez diren ikertzaileak prestatzeko Doktoratu Aurreko Programako laguntza (Ikerketa Orokorra, 2020/2021) jaso izana.

Idiazabal gaztaren ikerketa metagenomikoa: gaztagilearen eta heltze denboraren eragina mikrobiotan

Santamarina-García, G., Hernández, I., Amores, G. eta Virto, M.

Lactiker Ikerketa Taldea, Biokimika eta Biologia Molekularra saila, Farmazia Fakultatea, Euskal Herriko Unibertsitatea (UPV/EHU), Unibertsitate ibilbidea 7, 01006 Vitoria-Gasteiz. mailo.virto@ehu.eus

Laburpena

Orain arte garatutako ikerketek, esne gordinaz egindako gazten ezaugarri sentsorial bereziak gazta egiteko eta heltzeko prozesuetan gertatzen diren aldaketa mikrobiarrei egotzi dizkiete. Horregatik, ikerketa honetan Euskal Herriko Idiazabal gazta tradizionalaren mikrobiota aztertu zen DNAren sekuentziazio masiboaren bidez. Gaztagileak eta heltze denborak gaztaren mikrobiotan duten eragina erakutsi zuten emaitzek. Oro har, bakterio azido laktikoak (BALak) nagusi ziren eta hauen hazkuntza faboratu zen bi prozesuetan. Ingurumen-bakterio eta patogeno gehienak, aldiz, inhibitu egiten ziren, *Staphylococcus aureus* izan ezik. Garrantzitsua da aipatzea orain arte Idiazabal gaztan detektatu ez diren bakterioak identifikatu zirela, aromarekin erlazionatutako konposatuen sintesiarekin lotutakoak.

Hitz gakoak: Ardi-esne gordinezko gazta; heltzea; mikrobiota; 16S rRNAren sekuentziazioa.

Abstract

Research to date has attributed the special sensory properties of raw milk cheeses to the microbial shifts that occur during cheese production and ripening. Therefore, in this research the microbiota of the traditional Idiazabal cheese from Basque Country was analyzed by massive DNA sequencing. The results showed how the production and ripening processes determined the microbiota of the cheese. In general, lactic acid bacteria (LAB) were predominant and their growth was favored through both processes. Most environmental and pathogenic bacteria, however, were inhibited, except Staphylococcus aureus. It should be noted that some bacteria which until now had not been detected in Idiazabal cheese were identified, some of which are related to the synthesis of flavor compounds.

Keywords: ewe's raw milk cheese; ripening; microbiota; 16S rRNA sequencing.

1. Sarrera eta motibazioa

Gazta ezagutzen den elikagai bioteknologiko zaharrenetariko bat da (De Renobales et al., 2008). Bere jatorria duela 8000 urte ingurukoa dela uste da, animaliak hezi zirenean haragia, larruak edo esnea lortzeko, besteak beste (Barrientos eta Soria, 2020). Hala ere, zenbait teoria daude gaztaren aurkikuntza azaltzeko. Gehien onartutako hipotesiak azaltzen duen moduan, aurkikuntza akzidentala izan zen. Normalean, animalien urdailekin poltsak egiten ziren elikagaiak eta bestelakoak eramateko. Esnea horrelako poltsa batera gehitzerakoan, urdaileko hormetako digestio-entzimek esnea koagulatu zuten eta beroaren eraginagatik gatzatua eta seruma bereizi ziren. Gaur egun, gazta nutrizio-ezaugarri bikainak dituen oinarrizko elikagaia da, eta, merkatuan eskuragarri dagoen aniztasun handiari esker, zapore, usain eta ehundura anitzez gozatzeko aukera ematen digu (De Renobales et al., 2008). Urteko gazta-ekoizpena 20 milioi tonatik gorakoa dela kalkulatzen da, eta zifra horrek gora egin du azken 30 urteetan, % 4ko batez bestekoan urtero (Barrientos eta Soria, 2020; Fox et al., 2016).

Idiazabal gazta ardi Latxa edota Karrantzako ardien esne gordinarekin egiten den gazta gogorra da eta gutxienez, 60 eguneko heltze denbora duena. Idiazabal gazta Euskal Herrian produzitzen da, Erronkari haranean salbu, eta 1987. urtetik Idiazabal Gazta Jatorri Deiturak (JD) bere ekoizpena arautzen du. Gainera, 1996az geroztik, Europar Batasunak babesten dueneko elikagaia da, Europako Jatorri Deitura Babestu (JIB) gisa (DOCE, 1996).

Idiazabal gaztak, bai eta esne gordinarekin egindako beste batzuek, profil aromatiko aberatsagoa eta biziagoa dute esne pasteurizatuarekin egindakoekin alderatuta (Grappin eta Beuvier, 1997; Leroy eta De Vuyst, 2004), baita beste espezie batzuetako gaztekin alderatuta ere (Ordoñez et al., 1998). Ezaugarri sentsorial interesgarri horiek, aurrez, gaztaren heltze prozesuan sortzen diren mikroorganismoen arteko dinamika konplexuei egotzi zaizkie (Peláez eta Requena, 2005). Esne gordinaren kalitatea, kultibo abiarazleen erabilera, erabilitako gatzagi

mota edota heltze denbora dira gaztan garatzen den mikrobiota (mikroorganismo konposizioa) baldintzatzen duten faktoreetako batzuk (Cosentino eta Palmas, 1997). Esneko mikrobiotari dagokionez, askotarikoa eta konplexua da, baina Idiazabal gazta egiteko erabiltzen den esnearen kasuan, *Lactococcus*, *Lactobacillus* eta *Leuconostoc* generoetako bakterio azido laktikoek (BALek) osatzen dute nagusiki (Pérez-Elortondo et al., 1993, 1998). Bakterio horiek esnean dagoen laktosa metabolizatzen dute azido laktikoa sortuz, hortik beraien izendapena. Hala ere, beste konposatu batzuk ere sintetizatzen dituzte, adibidez, azido azetikoa, etanola, diazetiloa… (Thierry et al., 2015); eta konposatu horien arabera gaztaren ezaugarri sentsorialak aldatu egiten dira (Pérez-Elortondo et al., 1999; Thierry et al., 2015). Nahiz eta BALak nagusi izan, badira ekosistema mikrobiar horretan ugaritasun txikiagoko beste mikroorganismo batzuk ere. Ondorioz, azken produktuaren propietate organoleptikoei ere eragin diezaiekete (Centi et al., 2017; Niro et al., 2014; Pérez-Elortondo et al., 1999; Zheng et al., 2018).

2. Arloko egoera eta ikerketaren helburuak

2.1. Orain arte egindako ikerketa eta egungo egoera

Idiazabal gazten mikrobiota argitzeko asmoz, hainbat ikerketa garatu izan dira. Horrela, BALen eta garatutako bigarren mailako mikroorganismoen ezaugarriak deskribatu dira eta gaztaren ezaugarri organoleptikoekin erlazionatu dira (Pérez-Elortondo et al. 1998, 1993, 1999). Hala ere, lan horiek duela 20 urte garatu ziren mikrobiologiako oinarrizko tekniken bidez, hau da, hazkuntza-medioak erabiliz. Gaur egun, frogatu da bakterio askok egoera bideragarria baina erein ezina (VBNC, ingelesetik, viable but non-culturable) har dezaketela, hazkuntza-medioen bidez isolatzea eta identifikatzea eragotziz (Zhang et al., 2017). Beraz, ez da sakonki ezagutzen gaur egun produzitzen diren Idiazabal gazten mikrobiota.

2.2. Ikerketa metagenomikoa: oinarria eta metodologia

Gaztaren populazio mikrobiarrak identifikatzeko eta karakterizatzeko ikerketa metagenomikoa gauzatu zen. Ikerketa mota hauetan, laginean dagoen material genetiko guztia (metagenoma) erauzten da, ondoren DNAren zonalde espezifikoak aztertu ahal izateko (Yarza et al., 2014). Horrela, mikrobiologiako metodo tradizionalekin alderatuta, bakterio-espezie gehiago identifikatzea lortzen da, kantitate txiki samarretan daudenak (Ercolini et al., 2012; Masoud et al., 2012; Yarza et al., 2014), VBNC egoeran daudenak (Zhang et al., 2017), baita hazkuntza-metodoen mendekoak zein independenteak diren beste metodoen bidez detektatzen ez direnak ere (Alegría et al., 2012; Masoud et al., 2012; Yarza et al., 2014; Zhang et al., 2017). Hortaz, berriki garatutako DNAren sekuentziazio masiboko metodo hauek ekosistema mikrobiarren ikerketan sekulako iraultza ekarri dute, mikrobio-komunitateak aztertu ahal izan direlako hartzitutako elikagaietan, esaterako, esne gordineko gaztetan (Giello et al., 2017; Masoud et al., 2012; Park et al., 2019).

Espezie bakterianoak identifikatzeko, gene markatzaileen sekuentziazio metodoa eskuragarriena eta erabiliena da. Zehazki, gehien erabiltzen den gene markatzailea 16S rRNA (RNA erribosomikoa) da, nahiko informatiboa den eta kalitate-kontrola duten datu-baseetan sartuta dagoen gene markatzaile nagusiena delako (Yarza et al., 2014). Gainera, kostu txikiko eta abiadura eta doitasun handiko metodoa da (Zhang et al., 2017). 16S rRNA genearen teknikan, behin DNA guztia erauzita dagoenean, PCR (polimerasaren kate-erreakzio) baten bidez genearen V3-V4 zonalde aldakorrak anplifikatzen dira *primer* (abiarazle) espezifikoak erabiliz. Ondoren, lortutako sekuentzia anplifikatuak datu-baseetan jasotako erreferentziazkoekin alderatzen dira, homologiak bilatuz eta, azken batean, laginean dauden bakterioak identifikatuz (Yarza et al., 2014).

2.3. Ikerketaren helburuak

Idiazabal gazta tradizionalaren konposizio fisiko-kimikoa eta propietate sentsorialak nahiko aztertuak izan dira. Hala ere, mikrobiologiaren ikuspegitik, ikerketa gutxi gauzatu dira produktu hori osatzen duen mikrobiota guztia argitzeko asmoz. Horregatik, eta populazio mikrobiarrek produktuaren amaierako ezaugarrietan izan dezaketen eragina jakinda, ikerketa honen helburua Idiazabal gaztaren mikrobiota aztertzea da, bereziki gazta egiteko prozesuan eta heltze denboran zehar nola aldatzen den aztertuz.

3. Ikerketaren metodologia eta emaitzak

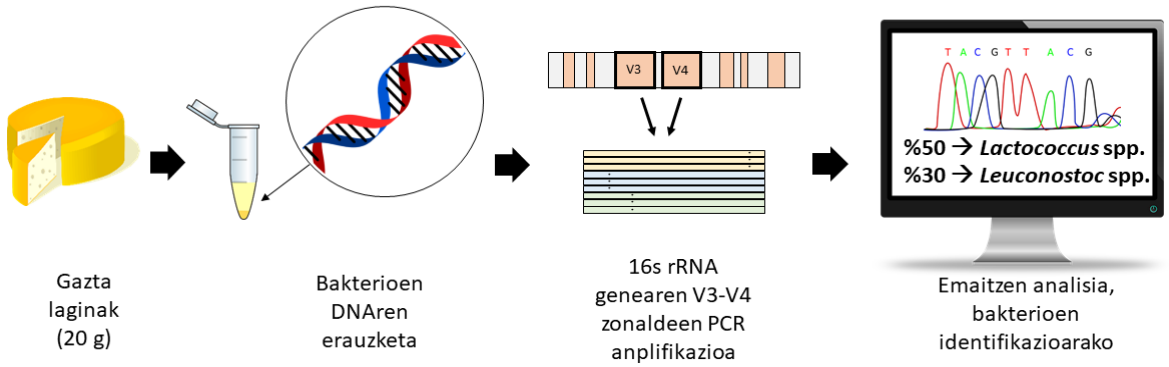
3.1. Metodologia

Arestian aipatutako helburua betetzeko, Jatorri Deiturari atxikitako 4 gaztandegiren (A, B, C eta D) laguntza izan zen. Ekoizle bakoitzeko esne-lagin bat (MA, MB, MC eta MD) eta gazta-lagin bi lortu ziren 6 heltze denboratan (1, 7, 14, 30, 60 eta 120 egun) (n = 52). Beraz, diseinu esperimentala honako hau izan zen:

4 (ekoizleak) x **1** (esne-lagina) + **4** (ekoizleak) x **6** (heltze denborak) x **2** (gazta-laginak) = **52 lagin**.

Azterketa metagenomikoa burutzeko, 1. irudian deskribatutako prozedurari jarraitu zitzaion. Laburbilduz, lehenik eta behin laginetatik DNA bakterianoa erauzi zen, Erkus et al.-en (2016) protokoloan oinarrituz eta *DNAeasy Blood & Tissue kit*a (Qiagen, Valentzia, CA, USA) erabiliz. Ondoren, erauzitako metagenomaren sekuentziazioa egin zen SGIkerreko Sekuentziazio Eta Genotipo Azterketen Unitatea-Genomika Zerbitzuan (UPV/EHU). Horretarako, 16S rRNA genearen liburutegia prestatu zen, *Nextera XT library* kitaren bidez eta ondoren, *Illumina MiSeq platform* batean 16S rRNA genearen V3-V4 zonalde hiperaldakorrak anplifikatuak izan ziren, Klindworth et al.-ek (2013) deskribaturiko *primer*rak erabiliz. Azkenik, emaitzei kalitate-kontrola aplikatu zitzaien eta sailkapen taxonomikoa egin zen *MiSeq Reporter* softwarea (Illumina Inc., San Diego, CA) erabiliz, *Greengenes* datu-basean oinarrituta; bai eta *MG-RAST* tresna (Meyer et al., 2008) erabiliz, *Silva SSU* datu-basean oinarrituta. Amaitzeko, lortutako emaitzak estatistikoki aztertuak izan ziren, *IBM SPSS* (IBM SPSS Inc., Chicago, 2019) eta *R softwarea* (R Core Team, 2020) erabiliz.

1. irudia. Idiazabal gazten ikerketa metagenomikoa gauzatzeko prozedura.



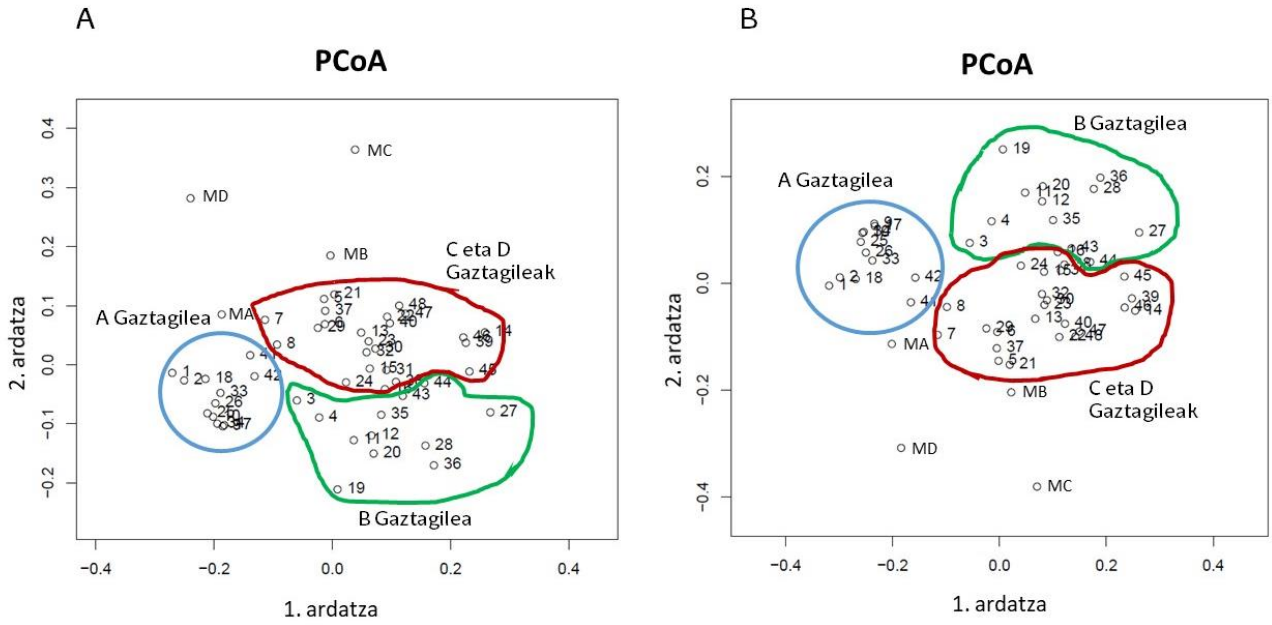
3.2. Bakterioen alfa- eta beta- dibertsitatea

Lehenik eta behin, alfa- eta beta- dibertsitatea aztertu ziren. Indize hauek, hurrenez hurren, lagin bakoitzean eta lagin ezberdinen artean dauden espezie bakterianoen aniztasuna eta aberastasuna neurtzen dituzte. Horrela, alfa indize ezberdinen bidez (*Shannon*, *Simpson*, *Inverse Simpson*, *Eevenness*, *Jevenness*, *Berger*, *Chao* eta *ACE*), heltzearen lehen hilabetera arte Idiazabal gaztaren mikrobiota bakterio espezie gutxi batzuek menderatzen zutela ikusi zen, baina ordutik aurrera beste espezie batzuk ugaritzen ziren. Emaitza horiek aztertuz, honako hau ondorioztatu zen: heltzearen lehen hilabetera arte gazta egiteko prozesuan kultibo abiarazle moduan gehitzen diren espezie bakterianoak nagusitzen dira, baina, handik aurrera ere nagusi izaten jarraitzen duten arren, esne gordinean aurkitzen diren beste espezie batzuk nabarmentzen hasten dira. Hortik, esne gordina erabiltzearen garrantzia, jatorrizko bakterioak amaierako produktuan agertzen direlako eta ezaugarri sentsorialetan eragin dezaketelako.

Era berean, beta dibertsitatea aztertu zen, Bray-Curtis eta Jaccard indizeetan oinarritutako koordenatu nagusien analisien (PCoA) bidez (2. Irudia). Horrela gazten mikrobiota gaztandegiaren arabera argi eta garbi ezberdina zela ikusi zen baita ere. Hain zuzen ere, A eta B ekoizleen gazten mikrobiotak beraien artean eta C eta D ekoizleekiko ezberdintzen ziren. Beraz, emaitza horiek pentsarazten ziguten agian gaztagileak erabakigarriak zirela gaztaren mikrobiotaren konposizioari dagokionez eta hortaz, amaierako Idiazabal gazten ezaugarriak zehaztu ahal zituztela. Horretaz gain, ikusten denez, ekoizle baten heltze denbora jakin bateko bi laginen

artean desberdintasunak daude. Hau, gazta beraren erreplikak ez direlako izan daiteke. Hots, lagin bakoitza esne berarekin eta ekoizpenerako jarraibide orokor berdinei jarraituz produzitu diren arren, gazta ezberdinak dira. Beraz, elaborazio baten eta bestearen artean desberdintasun txikiak egotekotan, mikrobiologikoki eragina izan dezakete.

2. irudia. Bakterio generoen beta dibertsitatea Bray-Curtis (A) eta Jaccard (B) indizeetan oinarrituta. Laginen identifikazioa 1etik 48ra doa. Horrela, 1etik 8ra bitarteko zenbakiak gaztagile bakoitzaren (A, B, C edo D) lehenengo heltze eguneko lagin bikoiztuei dagozkie. MA: A gaztagilearen esneari dagokio, MB: B gaztagilearen esneari dagokio; MC: C gaztagilearen esneari dagokio eta MD: D gaztagilearen esneari dagokio.



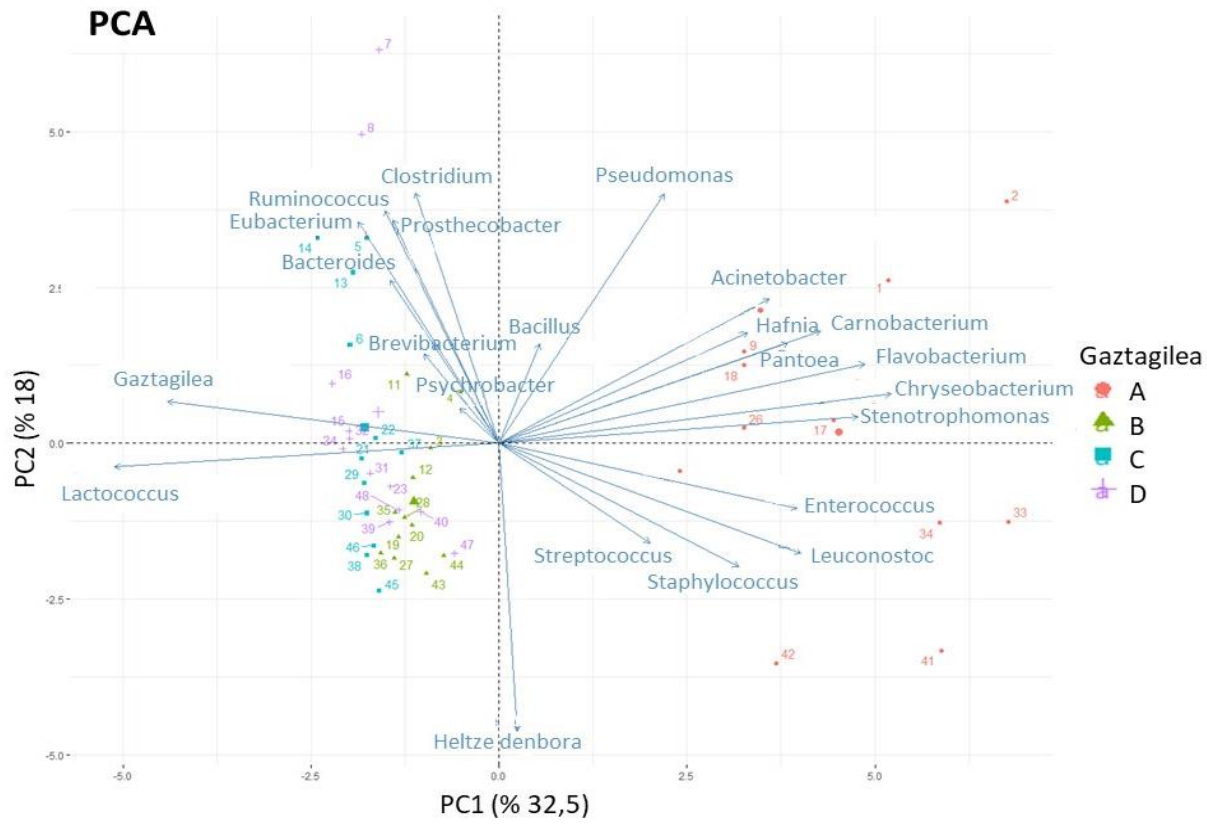
3.3. Gaztagilearen eta heltze denboraren eragina gaztaren mikrobiotan

Estatistikoki, bariantzaren azterketa permutazionala (PERMANOVA) gauzatu zen gaztagileen eta heltze denboraren eragina egiaztatzeko. Emaitzen arabera, bi faktoreek eragin estatistikoki oso esanguratsua zuten gaztaren mikrobiotan ($p < 0.001$). Hau da, bai artaldea maneiatzean, esnea lortzeko jetzialdian eta gazta egitean gaztagile bakoitzak jarraitzen dituen praktikek eta baldintzek (gaztagile faktorea), zein heltze denborak (heltze faktorea) Idiazabal gaztaren mikrobiota zehazten dute.

Horretaz gain, osagai nagusien analisia (PCA) egin zen bi faktoreen eragina aztertzeko (3. irudia). Ikus daitekeenez, gaztagile faktoreak korrelazio handia erakusten du lehen osagai nagusiarekin (PC1), hau da, ia ardatzaren gainean dago. Beraz, PC1 ardatzaren arabera argi eta garbi bereizten dira A ekoizlearen laginak eta gainerakoak. Bigarren osagai nagusiari (PC2ri) erreparatuz, heltze faktorearekin korrelazio handia du, hau da, laginen dispertsioan patroi argia ikusten da. Gazta ez hain helduak PC2ren balio positiboenetan banatzen dira eta gazta helduenen kasuan, aldiz, balio negatiboenetan. Horrela, aldaketa mikrobiarren patroi argiak ikusten dira gaztagilearen eta heltze denboraren arabera.

Zehazki, A ekoizlearen kasuan, lehenengo heltze egunetako gaztak *Carnobacterium*, *Flavobacterium*, *Hafnia*, *Pantoea* eta *Pseudomonas* generoek ezaugarritu zituzten. Heltzeak aurrera egin ahala, amaierako gaztetan *Leuconostoc*, *Enterococcus*, *Streptococcus* eta *Staphylococcus* populazioak nabarmendu ziren. Bestalde, B ekoizlearen gutxien heldutako gaztetan, *Psychrobacter*, *Bacillus* eta *Brevibacterium* generoen presentzia nabaria zen. Hala ere, B, C eta D ekoizleen kasuetan, heltzeak aurrera egin ahala mikrobiota sinplifikatu egin zen *Lactococcus* nagusituz.

3. irudia. Osagai nagusien analisia (PCA) 4 gaztandegietako eta heltze denbora ezberdinetako (1, 7, 14, 30, 60 eta 120 egun) laginak kontuan hartuz.



3.4. Bakterioen dinamikak gazta egiteko prozesuan eta heltze denboran zehar

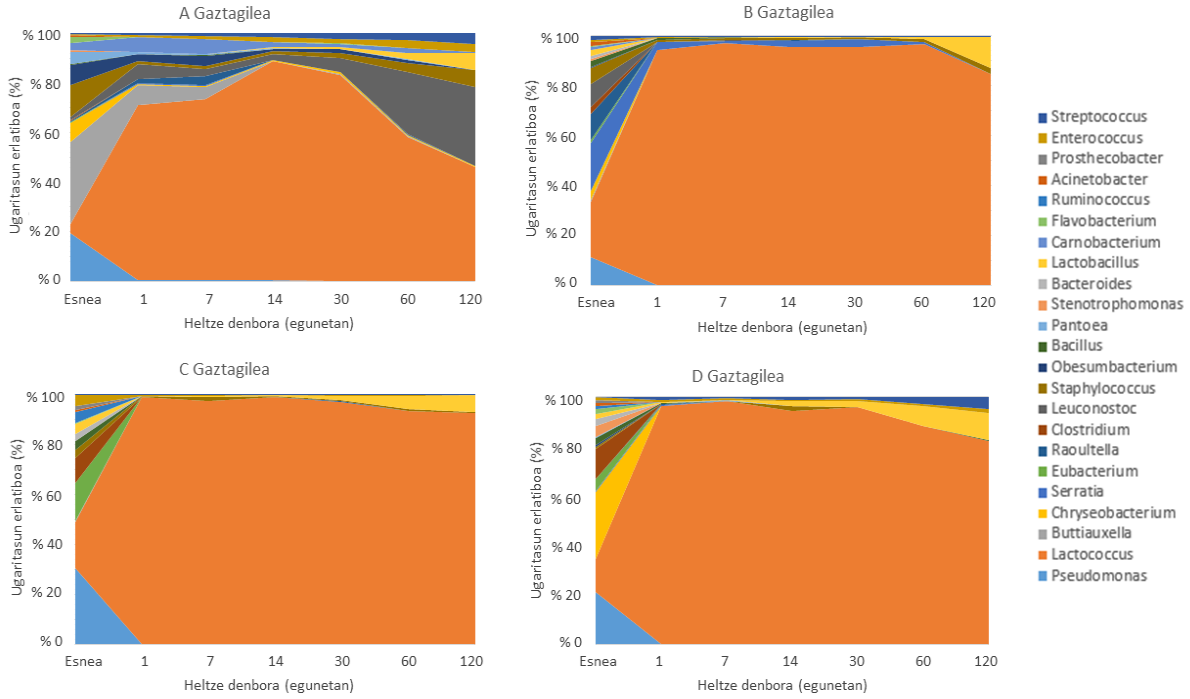
Idiazabal gaztak egiteko esne gordinetan 645 bakterio-genero identifikatu ziren. Hala ere, bakarrik 23 zeuden % 1etik gorako ugaritasunetan. Bakterio horiek honako talde hauetan bana zitezkeen: BALak (*Lactococcus, Leuconostoc, Lactobacillus…*); bakterio patogenoak, osasun arazoekin erlazionatu direnak *(Pseudomonas, Clostridium, Staphylococcus, Bacillus, Stenotrophomonas…*); eta ingurumenetik datozen bakterioak, patogenoak ez direnak, baina ezta onuragarriak ere (*Prosthecobacter, Psychrobacter, Cromohalobacter, Flavobacterium…*).

4. irudian ikus daitekeenez, gazta egiteko prozesuak nagusiki BALen hazkuntza faboratu zuen (batez beste, esnearen % 13,2tik lehenengo eguneko gaztaren % 78,3ra). Hala ere, inguruneko bakterio batzuen ugaritzea ere laguntzen zuen. Horrek aurretik Bokulich eta Millsek (2013) adierazitakoa berretsi zuen, hau da, gaztandegi bakoitzak mikrobiota propioa (ingelesez *household microbiota* esaten zaiona) du, zeinak gaztagileen artean bereiztea eragiten duen. Gure kasuan, lehenengo eguneko gaztak bereizten zituzten generoak honako hauek ziren: A ekoizlearen gaztak *Hafnia, Buttiauxella, Obesumbacterium* eta *Raoultella*k osatzen zituzten; B ekoizlearen gaztak *Brevibacterium, Psychrobacter* eta *Serratia*k; *Chromohalobacter*rek C ekoizlearen gaztak eta *Streptococcus*ek D ekoizlearen gaztak. Aipatzekoa da, ingurunetik datozen bakterioen artean, *Brevibacterium*, *Psychrobacter* eta *Hafnia* aromarekin erlazionatutako konposatuen ekoizpenarekin lotu direla, gaztarentzat onuragarriak direnak, eta *Serratia*, aldiz, akats aromatikoekin.

Gaztaren mikrobiotan heltze denborak izan zuen eraginari dagokionez, BALak faboratzen ziren bakterio bakarrak ziren (% 90,7-98,7 bitarteko ugaritasunean 120 egunetako gaztetan), denbora aurrera joan ahala inguruneko bakterioak eta patogeno gehienak inhibitzen zirelako. Izan ere, BALen barruan joera bat antzeman zen. A ekoizlearen kasuan, *Lactococcus* generoa heltzearen 14. egunera arte nagusi zela ikusi zen (% 69,3), batez ere kultibo abiarazle gisa gehitu zelako. Hala ere, ordutik aurrera, balioak jaitsi egin ziren (% 45,4) beste BAL batzuen ugaritzea faboratuz (*Leuconostoc, Lactobacillus*…) (4. irudia). Horrek adierazko luke, esne gordinean daudeneko BALak heltzean ugaldu eta azken produktuan nabarmendu daitezkeela.

Bestalde, inguruneko bakterioak inhibitzen zirenez eta aromarekin erlazionatutako konposatuen produkzioarekin zerikusia duten bakterioen (*Brevibacterium*, *Psychrobacter* edo *Serratia*) dinamikei erreparatuz, ondoriozta genezake heltzearen lehenengo asteetan bakarrik jardungo luketela (% 8,0ko ugaritasunean). Halaber, patogeno gehienak inhibitzen baziren ere, heltze denborak *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus pyogenes* eta *Enterococcus faecium* hazten laguntzen zuela ikusi zen. *S. aureus* da batez ere kontrola eskatzen duena elikagaien segurtasun-arazoak saihesteko, ugaritasun erlatibo altuetan (% 6,8) aurkitu zelako A gaztagilean.

4. irudia. Aldaketa mikrobiarrak gazta egiteko prozesuan eta heltze denboran zehar.



Oro har, gazta egiteko prozesuan eta heltze denboran zehar ematen diren ezaugarri kimiko fisikoen bilakaerak azalduko lituzke behatutako dinamika mikrobiarrak. Laburbilduz, gaztaren elaborazioan eta heltzean pH-a 4,5-5,3ko balioetara jaisteak, elaborazioan erabilitako NaCl kontzentrazio handiak eta bakterio gehienek gatzarekiko tolerantzia txikia izateak (halofiloak izan ezik: *Pseudomonas*, *Psychrobacter*, *Chromohalobacter*…), ur-aktibitatearen murrizketak eta erredox potentzialaren aldaketak, azalduko lukete inguruneko bakterio eta patogeno gehienak inhibitzea eta soilik BALak mantentzea.

4. Ondorioak

Oso ikerketa gutxi garatu dira DNAren sekuentziazio masiboan oinarrituta ardi-esne gordineko gaztetako mikrobiota aztertzeko. Hala ere, egiaztatu da oso tresna erabilgarria dela bakterio-populazioen dinamikak aztertzeko gazta egite eta heltze prozesuetan zehar. Era berean, gaztagile bakoitzak jarraitzen dituen praktikak edota baldintzak eta heltze denborak amaierako gaztaren mikrobiota zehazten dutela ikusi da. Oro har, bi prozesuek BALen ugaltzea faboratzen dute, amaierako gaztaren bakterio nagusiak izanik (% 90,7-98,7), baina heltzearen lehenengo asteak arte, aromaren erantzule diren konposatuen sintesiarekin erlazionaturiko bakterioen hazkuntza faboratzen da baita ere (batez beste, % 8,0). Gainerakoak, ingurunekoak eta patogenoak, inhibitu egiten dira, baina *S. aureus* azterketa eskatzen duen patogeno garrantzitsua da.

5. Etorkizunerako planteatzen den norabidea

Etorkizuneko ikerketetarako, interesgarria izango litzateke aztertzea gaztagileak aukeratzen dituen zein baldintzak edo praktikak eragiten duten batez ere gaztaren mikrobiotan. Era berean, mikrobiotaren eta gaztaren elikadura-kalitateari eta -segurtasunari eragiten dioten konposatuen arteko erlazioa aztertzea interesgarria izango litzateke, baldintza hoberenak aukeratu ahal

izateko kalitate goreneko Idiazabal gaztak lortzeko. Besteak beste, gaztaren kalitatearen aldetik gantz-azido askeak edota aromarekin erlazionatutako konposatu lurrunkorrak aztertu daitezke, gaztaren ezaugarri organoleptikoei erreparatuz, eta amina biogenoak elikagaien segurtasunaren ikuspegitik.

6. Erreferentziak

Alegría, Á., Szczesny, P., Mayo, B., Bardowski, J., eta Kowalczyk, M. (2012). Biodiversity in Oscypek, a traditional Polish Cheese, determined by culture-dependent and -independent approaches. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(6), 1890–1898.

Barrientos, M., eta Soria, C. (2020). *Dairy, Cheese Production by Country in 1000 MT*. IndexMundi. https://www.indexmundi.com/agriculture/?commodity=cheese&graph=production

Bokulich, N. A., eta Mills, D. A. (2013). Facility-specific «house» microbiome drives microbial landscapes of artisan cheesemaking plants. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(17), 5214–5223.

Centi, V., Matteucci, F., Lepidi, A., del Gallo, M. eta Ercole, C. (2017). Microbiological and biochemical aspects of inland Pecorino Abruzzese cheese. *Heliyon*, 3(2), e00258.

Cosentino, S., eta Palmas, F. (1997). Hygienic conditions and microbial contamination in six ewe's-milk-processing plants in Sardinia, Italy. *Journal of Food Protection*, 60(3), 283–287.

De Renobales, M., Barrón, L. J. R., Pérez-Elortondo, F. J., Virto, M., Albisu, M., Nájera, A. I., eta Ruiz de Gordoa, J. C. (2008). La investigación científica en el queso Idiazabal. *Rev. int. estud. vascos.*, 53(2), 395–431.

DOCE. (1996). Reglamento (CE) n° 1107/96 de la Comisión de 12 de junio de 1996 relativo al registro de las indicaciones geográficas y de las denominaciones de origen con arreglo al procedimiento establecido en el artículo 17 del Reglamento (CEE) nº 2081/92 del Consejo. *Diario Oficial de las Comunidades Europeas* (DOCE). 148, 1-10. https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX%3A31996R1107

Ercolini, D., De Filippis, F., La Storia, A., eta Iacono, M. (2012). «Remake» by high-throughput sequencing of the microbiota involved in the production of water Buffalo mozzarella cheese. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(22), 8142–8145.

Erkus, O., de Jager, V. C. L., Geene, R. T. C. M., van Alen-Boerrigter, I., Hazelwood, L., van Hijum, S. A. F. T., Kleerebezem, M., eta Smid, E. J. (2016). Use of propidium monoazide for selective profiling of viable microbial cells during Gouda cheese ripening. *International Journal of Food Microbiology*, 228, 1–9.

Fox, P. F., Guinee, T. P., Cogan, T. M., eta McSweeney, P. L. H. (2016). Fundamentals of cheese science, second edition. In *Fundamentals of Cheese Science, Second Edition*. New York: Springer US.

Giello, M., La Storia, A., Masucci, F., Di Francia, A., Ercolini, D., eta Villani, F. (2017). Dynamics of bacterial communities during manufacture and ripening of traditional Caciocavallo of Castelfranco cheese in relation to cows' feeding. *Food Microbiology*, 63, 170–177.

Grappin, R., eta Beuvier, E. (1997). Possible implications of milk pasteurization on the manufacture and sensory quality of ripened cheese. In *International Dairy Journal* (Libk. 7, Zenbakia 12, or. 751–761). Elsevier.

Klindworth, A., Pruesse, E., Schweer, T., Peplies, J., Quast, C., Horn, M., eta Glöckner, F. O. (2013). Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Research*, 41(1), 1–11.

Leroy, F., eta De Vuyst, L. (2004). Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends in Food Science and Technology*, 15(2), 67–78.

Masoud, W., Vogensen, F. K., Lillevang, S., Abu Al-Soud, W., Sørensen, S. J., eta Jakobsen, M. (2012). The fate of indigenous microbiota, starter cultures, Escherichia coli, Listeria innocua and Staphylococcus aureus in Danish raw milk and cheeses determined by pyrosequencing and quantitative real time (qRT)-PCR. *International Journal of Food Microbiology*, 153(1–2), 192–202.

Meyer, F., Paarmann, D., D'Souza, M., Olson, R., Glass, E. M., Kubal, M., Paczian, T., Rodriguez, A., Stevens, R., Wilke, A., Wilkening, J., eta Edwards, R. A. (2008). The metagenomics RAST server - A public resource for the automatic phylogenetic and functional analysis of metagenomes. *BMC Bioinformatics*, 9(1), 386.

Niro, S., Fratianni, A., Tremonte, P., Sorrentino, E., Tipaldi, L., Panfili, G., eta Coppola, R. (2014). Innovative Caciocavallo cheeses made from a mixture of cow milk with ewe or goat milk. *Journal of Dairy Science*, 97(3), 1296–1304.

Ordoñez, A. I., Ibañez, F. C., Torre, P., Barcina, Y., eta Pérez-Elortondo, F. J. (1998). Application of multivariate analysis to sensory characterization of ewes' milk cheese. *Journal of Sensory Studies*, 13(1), 45–55.

Park, W., Yoo, J., Oh, S., Ham, J. sang, Jeong, S. geun, eta Kim, Y. (2019). Microbiological characteristics of Gouda cheese manufactured with pasteurized and raw milk during ripening using next generation sequencing. *Food Science of Animal Resources*, 39(4), 585–600.

Peláez, C., eta Requena, T. (2005). Exploiting the potential of bacteria in the cheese ecosystem. *International Dairy Journal*, 15(6–9), 831–844.

Pérez-Elortondo, F. J., Albisu, M., eta Barcina, Y. (1993). Changes in the microflora of Idiazabal cheese with the addition of commercial lactic starters. *The Australian Journal of Dairy Technology*, 48, 10–14.

Pérez-Elortondo, F. J., Aldámiz, P., Albisu, M., eta Barcina, Y. (1998). Indigenous lactic acid bacteria in Idiazabal ewes' milk cheese. *International Dairy Journal*, 8(8), 725–732.

Pérez-Elortondo, F.J., Albisu, M., eta Barcina, Y. (1999). Physicochemical properties and secondary microflora variability in the manufacture and ripening of Idiazabal cheese. *Lait*, 79, 281–290.

R Core Team. (2020). *R: The R Project for Statistical Computing*. R Foundation for Statistical Computing. https://www.r-project.org/

Thierry, A., Pogačić, T., Weber, M., eta Lortal, S. (2015). Production of Flavor Compounds by Lactic Acid Bacteria in Fermented Foods. In F. Mozzi, R. R. Raya, & G. M. Vignolo (Arg.), *Biotechnology of Lactic Acid Bacteria: Novel Applications, Second Edition* (2nd arg., or. 316–330). John Wiley & Sons Ltd., Hoboken.

Yarza, P., Yilmaz, P., Pruesse, E., Glöckner, F. O., Ludwig, W., Schleifer, K. H., Whitman, W. B., Euzéby, J., Amann, R., eta Rosselló-Móra, R. (2014). Uniting the classification of cultured and uncultured bacteria and archaea using 16S rRNA gene sequences. *Nature Reviews Microbiology*, 12, 635–645.

Zhang, F., Wang, Z., Lei, F., Wang, B., Jiang, S., Peng, Q., Zhang, J., eta Shao, Y. (2017). Bacterial diversity in goat milk from the Guanzhong area of China. *Journal of Dairy Science*, 100(10), 7812–7824.

Zheng, X., Liu, F., Shi, X., Wang, B., Li, K., Li, B., eta Zhuge, B. (2018). Dynamic correlations between microbiota succession and flavor development involved in the ripening of Kazak artisanal cheese. *Food Research International*, 105, 733–742.

7. Eskerrak eta oharrak

Lan hau nazioartean garrantzia duen aldizkari batera bidaltzeko prozesuan dago. Egileek eskerrak eman nahi dizkiete Idiazabal JIBra atxikitako gaztagileei ikerketa honetan parte hartzeagatik. Ikerketa hau burutzeko dirulaguntza Eusko Jaurlaritzak eman zuen (Gasteiz, IT944-16). Gorka Santamarina-Garcíak eskerrak eman nahi dizkio Euskal Herriko Unibertsitateari doktorego aurreko kontratuagatik. Egileek eskertzen dute SGIkerrek (UPV/EHU) emandako laguntza teknikoa.

Glifosato herbizidak eragindako oxidazio-estresa *Amaranthus palmeri* belar txarrean

Vicente Eceiza, M., Gil-Monreal, M., Zabalza, A., eta Royuela, M.

Nafarroako Unibertsitate Publikoa, Zientziak Saila, IMAB (Institute for Multidisciplinary Research in Applied Biology)
mikel.vicente@unavarra.es

Laburpena

Ingurumen-baldintzak desegokiak direnean, landareek gehienetan oxidazio-estresa sufritzen dute. Ikerketa honek glifosato herbizidak *Amaranthus palmeri* belar txarreko glifosatoarekiko populazio sentikor batean eta erresistente batean oxidazio-estresa eragiten al duen zehaztea du helburu. Horretarako, hiru parametro aztertu dira: oxigeno espezie erreaktiboak, lipidoen peroxidazioa eta glutationa. Emaitzek oxidazio-estres moderatua adierazi dute populazio sentikorrean, glifosato-dosiaren arabera. Hala ere, oxidazio-estresa ez da landareen hilkortasunaren arrazoi nagusia. Populazio erresistentean glifosatoak ez du oxidazio-estresik eragin.

Hitz gakoak: glifosato, oxidazio-estres, *Amaranthus palmeri*

Abstract

When environmental conditions are not optimal, plants generally suffer oxidative stress. This research is to determine whether the herbicide glyphosate causes oxidative stress in two populations of the weed Amaranthus palmeri, *one sensitive and one resistant. In order to do that, three parametres have been analysed: reactive oxygen species, lipid peroxidation and glutathione. Results indicate a moderated oxidative stress in the sensitive population, dependent on the glyphosate dose. Nevertheless, oxidative stress is not the main cause of plant death. In the resistant population, glyphosate does not cause oxidative stress.*

Keywords: glyphosate, oxidative stress, Amaranthus palmeri

1. Sarrera eta motibazioa

Beste izaki bizidun gehienak bezala, landareak aerobioak dira, alegia, oxigenoa arnasten dute energia lortzeko. Ezaguna denez, oxigenoa ezinbestekoa da landareak bizi ahal izateko. Hain ezaguna ez dena da oxigenoa nolabait toxikoa dela, bigarren mailako efektuak eragiten baititu arnasten duten organismoengan. Zehazki, molekula toxikoena ez da berez oxigeno molekular arrunta, oxigeno espezie erreaktiboak (OEE) baizik. OEE garrantzitsuenak superoxidoa (O_2^-), oxigeno peroxidoa (H_2O_2) eta hidroxil erradikala ($OH\cdot$) deritzenak dira. OEEak oxigenoak esku hartzen duen prozesu metaboliko guztietan sortzen dira oxidazio-erreakzioen ondorioz, eta kalteak eragin ditzakete organismoarengan, adibidez, lipidoak edota beste biomolekulak oxidatuz (Craig, d.g.).

Oxidazio-erreakzioak bizitzarako ezinbestekoak direnez, OEEn sorkuntza saihestezina da. Hortaz, landareek (eta beste organismo aerobioek), OEEi aurre egiteko, sistema antioxidatzaileak garatu dituzte. Antioxidatzaileak beste molekulen oxidazioa atzeratu edo ekiditeko gai diren molekula askotarikoak dira. Horien artean azidoak, entzimak eta beste mota batzuetako molekulak daude; era berdinean, antioxidatzaile bakoitzak modu batean jokatzen du, orokorrean, OEE jakin bat bahitzen edo suntsitzen. Landareetan, antioxidatzaile garrantzitsuenetariko bat glutationa da. Glutationak oxigeno peroxidoa harrapatu eta ur bilakatzen du, bere burua oxidatzearen truke (1. formula).

1. formula. Hidrogeno peroxidoaren agortzea glutationaren eraginez.

GSH	+	$H_2O_2 \rightarrow$	GSSG	+	H_2O
(glutation erreduzitua)			(glutation oxidatua)		

Baldintza normaletan, OEEn sorkuntzaren eta antioxidatzaileen aktibitateak orekatuta egoten dira. Haatik, zenbait kasutan OEEn sorkuntza azkartu egiten da. Kasu honi oxidazio-estres edo estres oxidatibo deritzo. Oxidazio-estresa ingurumen-baldintza desegokietan gertatzen da, hala nola, lehorteetan, muturreko tenperaturetan eta belarjale gehiegi daudenean. Baldintza hauek eragindako OEEn sorkuntzari landareek aktibitate antioxidatzailearen igoerarekin erantzun diezaiokete. Aitzitik, arduera antioxidatzailea ez bada igotzen edo hau ez bada nahikoa, lipidoen peroxidazioa eta beste oxidazio-kalteak gertatuko dira (Demidchik, 2015).

Kanpoko produktu kimiko batzuek ere oxidazio-estresa eragin dezakete landareetan, herbizida batzuk barne. Herbizidak edo belarhilkariak belar txarrak ezabatzeko edota haien ugalketa eta hazkuntza eragozteko erabiltzen diren konposatu kimikoak dira. Bere aldetik, belar txarrak giza asentamenduetan (batez ere laborantzetan, baina baita parkeetan, lorategietan, etab.) naturalki eta giza eraginik gabe hazten diren landareak dira. Mundu-mailan gehien erabiltzen den herbizida glifosatoa da. Urte askotan zehar, glifosatoak eraginkortasun handia erakutsi du belar txar problematiko guztien aurka, eta gaur egun ere nekazaritzako oinarrizko tresna izaten jarraitzen du (Duke et al., 2018; Westwood et al., 2018). Azken urteetan, aldiz, belar txarren populazio erresistente anitz aurkitu dira, hau da, glifosatoaren aplikazioari bizirauteko gaitasuna duten landare-populazioak, aplikazio horrek baldintza normaletan landarea hilko lukeenean. Glifosatoarekiko populazio erresistenteak dituzten belar txarren espezieetatik, seguruenik gehien kezkatzen duena *Amaranthus palmeri* S Wats. da, amerikar jatorrikoa eta oso problematikoa arto, soja eta kotoi soroetan (Recasens, 2020).

Glifosatoaren ekintza-mekanismoa entzima bat (5-enolpirubilsikimato-3-fosfato sintasa edo EPSPS) blokeatzean eta aminoazido aromatikoen sintesia inhibitzean datza. *A. palmeri*-ko glifosatoarekiko ale erresistenteek EPSPS entzima kodifikatzen duen genearen kopia asko dituzte, eta honi esker dira erresistenteak. Herbizidaren ekintza mekanismoak eta landareen erresistentziak, printzipioz, ez lukete oxidazio-estresarekin erlaziorik izan behar. Hala ere, zenbait ikerketek oxidazio-estresa glifosatoaren bigarren mailako efektua izan daitekeela landareetan iradoki dute. Oxidazio-estres hau, besteak beste, OEEn, lipidoen peroxidazioaren edota glutationaren aktibitatearen igoeran agertuko litzateke (Iummato et al., 2019; Liu et al., 2019; Sergiev et al., 2006).

2. Helburuak

Glifosatoak kaltetutako landareetan nolabaiteko oxidazio-estresa eragiten duela jakina den arren, haren garrantzi erlatiboa edo landarearen hilkortasunaren faktore erabakigarria ote den oraindik ez dago argi. Are gutxiago ezagutzen da belar txarren glifosatoarekiko erresistentziarekin duen erlazioaz. Horrela, ikerketa honen azken xedea glifosatoak eragiten duen oxidazio-estresa *A. palmeri*-ren bi populazioetan (bata glifosatoarekiko sentikorra eta bestea erresistentea) zehaztea da. Zehazki, ikerketa honen helburuak horrela laburbil daitezke:

- Glifosatoak oxidazio-estresa eragiten duela baieztatzea.
- Oxidazio-estresa glifosatoarekin tratatutako landareen hilkortasunaren arrazoi nagusia al den argitzea.
- Bi populazioen glifosatoarekiko erantzuna erkatzea.

3. Materialak eta metodologia

3.1. Landareen hazkuntza eta tratamendua

Landareak Fernández-Escalada et al. (2016) erabilitako metodoarekin landatu eta zaindu ziren. *A. palmeri*-ren bi populazio aztertu ziren: glifosatoarekiko sentikorra eta erresistentea. Biak Ipar Carolinan dute jatorria eta jatorrizko haziak Gaines Doktoreak (Colorado State Unibertsitatea, Fort Collins, CO, Estatu Batuak) eskaini zizkion Nafarroako Unibertsitate Publikoari. Ikerketa-taldearen aurreko ikerketetan, populazio hauen hurrenez hurrengo sentikortasuna eta erresistentzia berretsi zen (Fernández-Escalada et al., 2016).

Landareei glifosato-dosi ezberdinak aplikatu zitzaizkien, 3 L/Ha-ko gomendatutako dosia (GD) erreferentzia gisa hartuz: landare sentikorrei 0,5 aldiz GD, GD, 2 aldiz GD eta 3 aldiz GD aplikatu zitzaizkien; landare erresistenteei, berriz, GD, 2 aldiz GD, 3 aldiz GD eta 6 aldiz GD aplikatu zitzaizkien. Bi populazioetan landare kontrol batzuk bereiztu ziren, alegia, glifosatorik aplikatu ez zitzaizkien landareak. Herbizida komertziala Fortin Green® izan da. 0,5 GD nahikoa izan zen landare sentikorrak hiltzeko; erresistenteak 6 GD-rekin ere ez ziren hil, ordea. Glifosatoa ihinztatuz aplikatu zen.

3.2. Determinazio analitikoak

Determinazio analitiko guztiak egiteko landareen hostoak erabili ziren. Bi OEEn edukia neurtu zen: superoxidoa (O_2^-) eta oxigeno peroxidoa (H_2O_2). Superoxido edukia Romero-Puertas et al., (2004) erabilitako metodoaz neurtu zen. H_2O_2 edukia Daudi eta O'Brienek (2012) erabilitako metodoaz neurtu zen. Bi metodo hauek hosto-diskoak adierazle batekin tindatzean dautza. Bi OEEn edukia hosto-disko freskoetan neurtu zen glifosatoaren aplikaziotik bost egun pasa ostean.

Malondialdehido (MDA) eta glutation edukiak neurtzeko izoztutako eta birrindutako hosto-ehuna erabili zen. Hostoen izozketa glifosatoaren aplikaziotik hiru egun pasa ostean egin zen. MDA edukia lipidoen peroxidazioaren adierazletzat hartu zen eta espektrofotometrikoki neurtu zen (Hodges et al., 1999). Glutation edukia laserrak eragindako fluoreszentzia-detektagailu batez hornitutako elektroforesi kapilarraz neurtu zen (Zulet et al., 2013).

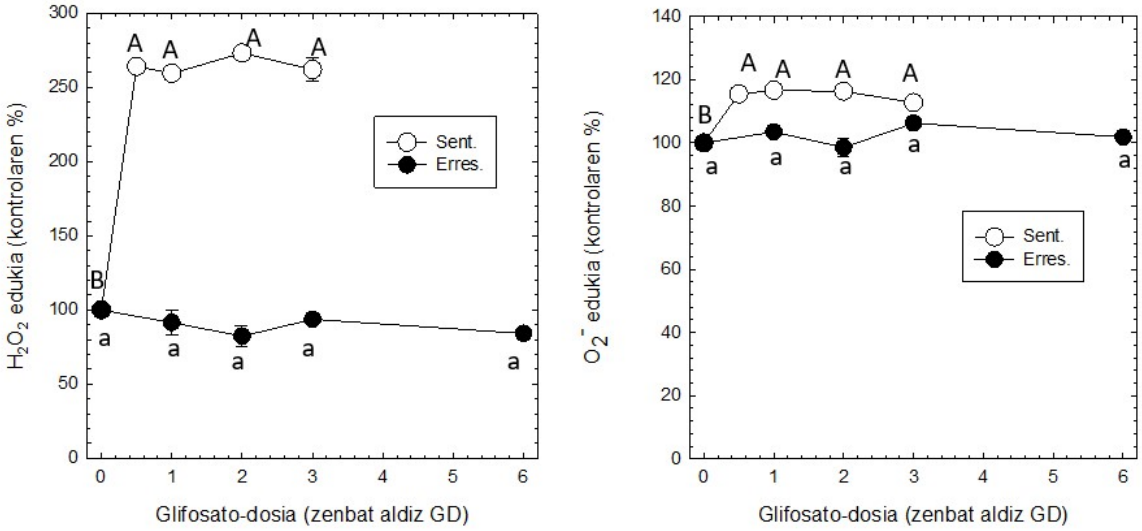
3.3. Analisi estatistikoa

Batez besteko balio bakoitza populazio eta tratamendu bereko landare desberdinen laginak erabiliz kalkulatu zen. Bi populazioetako kontrol-landareen arteko desberdintasun posibleak Student-en t testarekin ebaluatu ziren. Irudietan, desberdintasun esanguratsuak ($p < 0,05$) izartxoekin adierazita daude. Populazio bereko eta tratamendu desberdineko landareen arteko desberdintasun posibleak ANOVA analisiarekin ebaluatu ziren. Irudietan, desberdintasun esanguratsuak ($p < 0,05$) hizki desberdinekin adierazita daude. Analisi estadistiko guztiak egiteko SPSS 18.0 softwarea erabili zen.

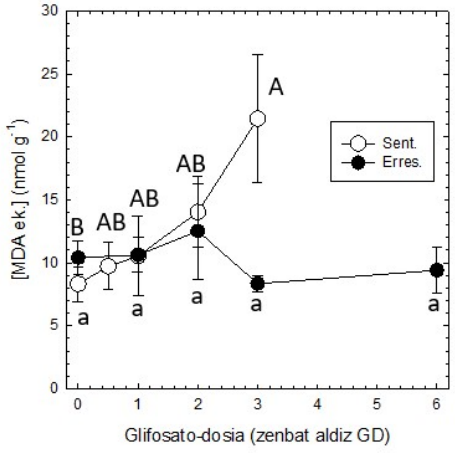
4. Emaitzak

1. irudian adierazten denez, neurtutako bi OEEn edukia nabarmenki igo zen glifosatoaren ondorioz populazio sentikorrean, batez ere hidrogeno peroxidoa. Hala ere, glifosato-dosi ezberdinek antzerako efektua eragin zuten, kontrola izan ezik, ez baitago desberdintasun esanguratsurik tratamenduen artean. Populazio erresistenteko landare guztietan OEEn edukierako balioak oso antzerakoak dira, tratamendua edozein dela ere.

1. irudia. Hidrogeno peroxido edukia (ezk.) eta superoxido edukia (esk.), populazio sentikorrean (txuria) eta erresistentean (beltza), glifosatoko dosi desberdinekin tratatuak, gomendatutako dosia (GD) aplikatu den aldietan adierazita. Batez besteko balioak errore estandarrekin adierazi dira. Desberdintasun esanguratsuak ($p < 0,05$) hizki desberdinekin adierazita daude: populazio sentikorra hizki larriekin eta populazio erresistentea hizki txikiekin.



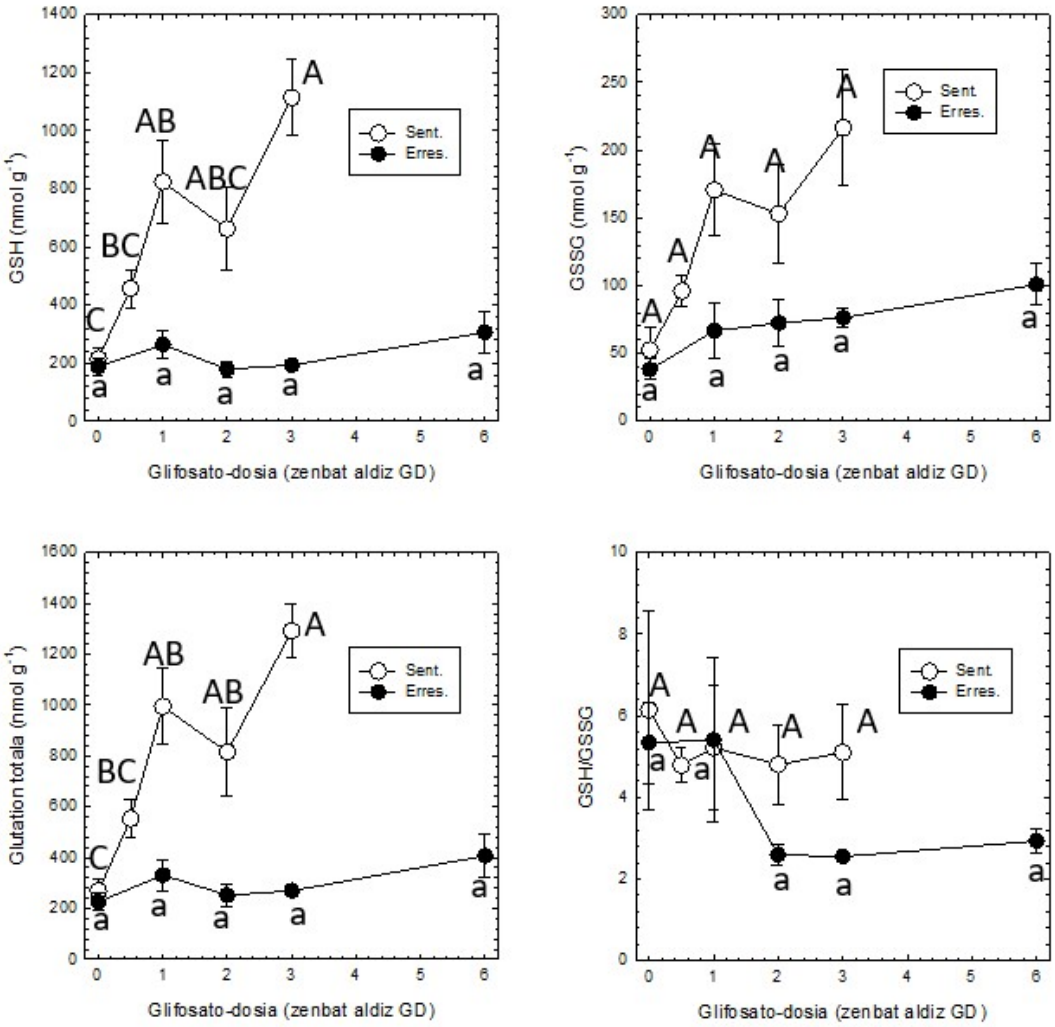
Lipidoen peroxidazioari dagokionez, 2. irudian adierazten den bezala, populazio sentikorrean MDA edukia igotzen da glifosato-dosiaren arabera. Igoera nabarmena da, batez ere 3 GD tratamendukoa. Populazio erresistentean, aldiz, ez dago desberdintasunik tratamenduen artean.



2. irudia. MDA kontzentrazioa, populazio sentikorrean (txuria) eta erresistentean (beltza), glifosatoko dosi desberdinekin tratatuak, gomendatutako dosia (GD) aplikatu den aldietan adierazita. Batez besteko balioak errore estandarrekin adierazi dira. Desberdintasun esanguratsuak ($p < 0,05$) hizki desberdinekin adierazita daude: populazio sentikorra hizki larriekin eta populazio erresistentea hizki txikiekin.

Populazio sentikorrean ikusitako OEEn eta lipidoen peroxidazioaren igoera glutation edukieraren igoerarekin batera doa. 3. irudian ikusi ahal denez, landare sentikorretan glutation edukia glifosato-dosiaren arabera proportzionalki igotzen da. Igoera hau GSH-ri esker gertatzen da. GSSG pixka bat igotzen da, nahiz eta esanguratsua ez izan. Honen ondorioz, glutation oxidatu eta erreduzituaren arteko kozientea ere ez da aldatzen. Populazio erresistentean, berriro ere, balio guztiak antzekoak dira, 3. irudian azaltzen den bezala.

3. irudia. GSH, GSSG eta glutation totalaren kontzentrazioa; eta GSH/GSSG kozientea, populazio sentikorrean (txuria) eta erresistentean (beltza), glifosatoko dosi desberdinekin tratatua, gomendatutako dosia (GD) aplikatu den aldietan adierazita. Batez besteko balioak errore estandarrekin adierazi dira. Desberdintasun esanguratsuak ($p < 0,05$) hizki desberdinekin adierazita daude: populazio sentikorra hizki larriekin eta populazio erresistentea hizki txikiekin.



5. Eztabaida

Aurkeztutako emaitzek OEEn, oxidazio-kaltearen (lipidoen peroxidazioa) eta jarduera antioxidatzailearen (glutationa) igoera baieztatu dute glifosatoaren ondorioz landare sentikorretan. Honek glifosatoak nolabaiteko oxidazio-estresa eragin duela berresten du. Emaitzek bat egiten dute aurreko hainbat ikerketekin. Zehazki, ikerketa askok aurkitu dute glifosatoak OEEen produkzioa azkartu egiten duela espezie anitzeko landare sentikorretan (Ahsan et al., 2008; Gomes eta Juneau, 2016; Iummato et al., 2019; Liu et al., 2019; Piasecki et al., 2019). Hala ere, hau ez da glifosatoaren ekintza mekanismoaren ondorio zuzen bat. Izan ere, glifosatoak zergatik laguntzen duen OEEak sortzen ez dago argi. Gomesek eta Juneauk (2016) mitokondrietan jartzen dute jatorria. Haiek diotenez, glifosatoak mitokondrietako arnasketa zelularra kaltetzen du eta bertako OEEn produkzioa ugaritzen da.

Glifosatoaren eraginez sortutako OEE kopuru apartaren ondorioz (1. irudia), funtsezko biomolekula batzuk oxidatzen dira, lipidoen peroxidazioaren emaitzek adierazten duten bezala (2. irudia). Berriro ere, emaitza hauek beste espezieekin egindako ikerketekin bat datoz (Liu et al., 2019; Meloni et al., 2019; Radwan eta Fayez, 2016; Soares et al., 2019). Dena den, beste ikerketa batzuek ez dute glifosatoak eragindako peroxidazio lipidikorik erakusten (Moldes et al., 2008). Batez ere, hau glifosato-dosi baxuak aplikatzean gerta daiteke. Izan ere, hemen azaltzen diren emaitzetan, soilik 3 GD aplikatuz gero ikusten dira desberdintasun esanguratsuak lipidoen peroxidazioan (2. irudia), OEEn kasuan 0,5 GD nahikoa denean desberdintasun oso nabarmengarriak ikusteko (1. irudia).

Ziurrenik, OEEn eta lipidoen peroxidazioaren arteko desfaseak jarduera antioxidatzailearekin zerikusia du. Emaitzek adierazten duten bezala, glutation kopuruak gora egiten du glifosato-dosiarekin (3. irudia). Beregainki, glutation erreduzitu kopurua da gehien igotzen dena. 1. formulan ikusi ahal den bezala, glutation erreduzitua da H_2O_2 harrapatzeaz eta hortaz bere ondorioak murrizteaz edota atzeratzeaz arduratzen dena. Orokorrean, glifosatoak eragindako H_2O_2 edukiaren igoerari glutationaren eta beste antioxidatzaileen sintesiaren gorakadak jarraitzen dio. Hala, argi dago glutationaren sintesia H_2O_2 eduki handituaren ondorio zuzena dela (Iummato et al., 2019).

Hau guztia soilik landare sentikorretan ikusi ahal izan da. Landare erresistenteetan, berriz, emaitza hauek kontrakoa adierazten dute: tratatutako landareek eta tratatu gabekoek balio berdinak dituzte eta, beraz, glifosatoak ez du oxidazio-estresik eragin. Oxidazio-estresaren arloan, oso ikerketa gutxi egin dira glifosatoarekiko landare erresistenteekin, baina eskuragarri dauden ikerketa apurrek norabide berean seinalatzen dute (Maroli et al., 2015; Moldes et al., 2008; Piasecki et al., 2019).

Datu hauekin, zaila da zehaztea oxidazio-estresak zenbateko garrantzia duen glifosatoarekin tratatutako landareen hilkortasunean. Dena den, tratatutako landare sentikor guztiak hil zirela kontuan hartzekoa da, alegia, glifosato-dosi oso baxua nahikoa da hauek akabatzeko. Aitzitik, oxidazio-estresari lotutako kalteak (lipidoen peroxidazioa) soilik glifosato-dosi altuekin dira nabarmenak. Honek esan nahi du oxidazio-estresa ez dela hilkortasunaren arrazoi nagusia glifosatoarekin tratatutako landareetan.

6. Ondorioak eta etorkizunerako norabidea

Laburbilduz, *A. palmeri*-ren banakako sentikorretan, glifosatoaren aplikazioak OEEn sorkuntza azkartzen du. OEEn ohiz kanpoko kontzentrazioak lipidoen peroxidazioa eragiten du eta jarduera antioxidatzailea pizten du. Jarduera antioxidatzailearen emendioak, bere aldetik, lipidoen peroxidazio hori nolabait murrizten du. Glifosatoak eragindako oxidazio-estresak kalte egiten die landare sentikorrei, nahiz eta hilkortasunaren arrazoi nagusia ez izan. Litekeena da heriotza herbizida honek eragindako hainbat efektu fisiologikoen ondorioa izatea, oxidazio-estresa barne. Glifosatoarekiko erresistentzia duten aleetan, berriz, glifosatoaren aplikazioaren ondoren ez da OEE edukia handitzen eta, beraz, ez dago ondoriorik oxidazio-estresean edo jarduera antioxidatzailean.

Ikerketa arlo konkretu honetan, glifosatoaren bigarren mailako efektu ugari oraindik ez dira ondo ezagutzen, ezta belar txar askoren erantzun fisiologikoa ere. Glifosatoak eta beste herbizidek belar txarren bizi-funtzioak zehazki nola oztopatzen dituzten ezagutzea funtsezkoa da belar txarren kudeaketa efiziente bat lortzeko. Hala ere, belar txarren populazio erresistenteen agerketak ohartzat hartu beharko genuke. Herbizidak oso erabilgarriak badira ere, haien aplikazio masiboa ez da jasangarria eta, epe luzera, belar txarren kontrol integral batera jo beharko da.

7. Erreferentziak

Ahsan, N., Lee, D. G., Lee, K.W., Alam, I., Lee, S.H., Bahk, J. D., & Lee, B.H. (2008). Glyphosate-induced oxidative stress in rice leaves revealed by proteomic approach. *Plant Physiology and Biochemistry*, *46*(12), 1062–1070.

Craig, M. D. (d.g.). Nola erreaktiboa oxigeno molekula funtzioa [kontsultatua: 2021 mar 9]. Webgunea: https://eu.approby.com/nola-erreaktiboa-oxigeno-molekula-funtzioa/

Daudi, A., & O'Brien, J. A. (2012). Detection of Hydrogen Peroxide by DAB Staining in Arabidopsis Leaves. *Bio-Protocol*, *2*(18), e263.

Demidchik, V. (2015). Mechanisms of oxidative stress in plants: From classical chemistry to cell biology. *Environmental and Experimental Botany*, *109*, 212–228.

Duke, S. O., Powles, S. B., & Sammons, R. D. (2018). Glyphosate – How it became a once in a hundred year Herbicide and its future. *Outlooks on Pest Management*, *29*(6), 247–251.

Fernández-Escalada, M., Gil-Monreal, M., Zabalza, A., & Royuela, M. (2016). Characterization of the Amaranthus palmeri physiological response to glyphosate in susceptible and resistant populations. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *64*(1), 95–106.

Gomes, M. P., & Juneau, P. (2016). Oxidative stress in duckweed (Lemna minor L.) induced by glyphosate: Is the mitochondrial electron transport chain a target of this herbicide? *Environmental Pollution*, *218*, 402–409.

Hodges, D. M., DeLong, J. M., Forney, C. F., & Prange, R. K. (1999). Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. *Planta*, *207*(4), 604–611.

Iummato, M. M., Fassiano, A., Graziano, M., dos Santos Afonso, M., Ríos de Molina, M. del C., & Juárez, Á. B. (2019). Effect of glyphosate on the growth, morphology, ultrastructure and metabolism of Scenedesmus vacuolatus. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *172*(January), 471–479.

Liu, X., Ma, D., Zhang, Z., Wang, S., Du, S., Deng, X., & Yin, L. (2019). Plant lipid remodeling in response to abiotic stresses. *Environmental and Experimental Botany*, *165*(March), 174–184.

Maroli, A. S., Nandula, V. K., Dayan, F. E., Duke, S. O., Gerard, P., & Tharayil, N. (2015). Metabolic profiling and enzyme analyses indicate a potential role of antioxidant systems in complementing glyphosate resistance in an Amaranthus palmeri biotype. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *63*(41), 9199–9209.

Meloni, D. A., Targa, G., Fraño, A., Ledesma, R., Silva, M. C., & Catán, E. A. (2019). La deriva de glifosato inhibe la fotosíntesis y produce estrés oxidativo en Eucalyptus camaldulensis. *Quebracho*, *27*, 5–12.

Moldes, C. A., Medici, L. O., Abrahao, O. S., Tsai, S. M., & Azevedo, R. A. (2008). Biochemical responses of glyphosate resistant and susceptible soybean plants exposed to glyphosate. *Acta Physiologiae Plantarum*, *30*(4), 469–479.

Piasecki, C., Carvalho, I. R., Cechin, J., Goulart, F. A. P., da Maia, L. C., Agostinetto, D., … Vargas, L. (2019). Oxidative stress and differential antioxidant enzyme activity in glyphosate-resistant and-sensitive hairy fleabane in response to glyphosate treatment. *Bragantia*, *78*(3), 379–396.

Radwan, D. E. M., & Fayez, K. A. (2016). Photosynthesis, antioxidant status and gas-exchange are altered by glyphosate application in peanut leaves. *Photosynthetica*, *54*(2), 307–316.

Recasens, J. (2020). Amaranthus palmeri . Una seria amenaza de nuestros campos de maíz. *Phytoma* , 321.

Romero-Puertas, M. C., Rodríguez-Serrano, M., Corpas, F. J., Gómez, M., Del Río, L. A., & Sandalio, L. M. (2004). Cadmium-induced subcellular accumulation of O2.- and H2O2 in pea leaves. *Plant, Cell and Environment*, *27*(9), 1122–1134.

Sergiev, I. G., Alexieva, V. S., Ivanov, S. V, Moskova, I. I., & Karanov, E. N. (2006). The phenylurea cytokinin 4PU-30 protects maize plants against glyphosate action. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, *85*(3), 139–146.

Soares, C., Pereira, R., Spormann, S., & Fidalgo, F. (2019). Is soil contamination by a glyphosate commercial formulation truly harmless to non-target plants? – Evaluation of oxidative damage and antioxidant responses in tomato. *Environmental Pollution*, *247*, 256–265.

Westwood, J. H., Charudattan, R., Duke, S. O., Fennimore, S. A., Marrone, P., Slaughter, D. C., … Zollinger, R. (2018). Weed management in 2050: Perspectives on the future of weed science. *Weed Science*, *66*(3), 275–285.

Zulet, A., Zabalza, A., & Royuela, M. (2013). Phytotoxic and metabolic effects of exogenous quinate on Pisum sativum L. *Journal of Plant Growth Regulation*, *32*(4), 779–788.

8. Eskerrak eta oharrak

- Eskerrik asko Gustavo Garijori laguntza teknikoagatik.

- Lan hau Eusko Jaurlaritzaren diru-laguntza bati esker eta Espainiako Ekonomia Ministerioari esker (AGL2016-77531-R) finantziatu da.

Zamorako zeramiken beiratua egiteko zeramikariek erabilitako galenaren jatorrizko meatzearen identifikazioa, berun isotopoen analisiaren bidez

Sanchez-Garmendia, U.[1], Billström, K.[2], Kielman, M.[2], Bellucci, J.[2], Kooijman, E.[2], Arana, G.[3], García Iñañez, J. [4]

[1]*GPAC, Ondare Eraikiari Buruzko Ikerketa Taldea, Kimika Analitikoa Saila, Zientzia eta Teknologia Fakultatea, Euskal Herriko Unibertsitatea (UPV/EHU).*

[2]*Naturhistoriska Riksmuseet, Geozientziak Saila, Box 500007, Estokolmo, SE-10405, Suedia.*

[3]*IBeA, Ikerkuntza eta Berrikuntza Analitikoa, Kimika Analitikoa Saila, Zientzia eta Teknologia Fakultatea, Euskal Herriko Unibertsitatea (UPV/EHU).*

[4]*GPAC, Ondare Eraikiari Buruzko Ikerketa Taldea, Geografia, Historiaurrea eta Arkeologia Saila, Micaela Portilla Ikerketa Ikergunea, Euskal Herriko Unibertsitatea (UPV/EHU).*

uxue.sanchez@ehu.eus

Laburpena

Lan honetan Zamorako XV-XX. mendeetako zeramika beiraztatuak aztertu dira, garai haietako merkataritzari, zeramiken eta lehengaien banaketa-fluxuari eta eskualde barneko zein eskualdeen arteko merkataritza-sareei buruz sakon ikertzeko. Honetarako, beiratuak egiteko erabilitako berunaren jatorri geologikoa aztertu da beiratuaren berunaren konposizio kimikoa neurtuz eta berunaren arrazoi-isotopikoak kalkulatuz. Horrela ondorioztatzen da Zamora probintziako beiratu zeharrargiak egiteko beruna Linares-La Carolina edota Alcudia inguruetan ustiatu zela.

Hitz gakoak: arkeometria; zeramika; beiratua; beruna; isotopoak; LA-ICP-MS

Abstract

In this work, glazed Zamoran pottery of the 15th-20th centuries has been studied to deepen into the knowledge of trade, of the distribution of ceramics and raw materials, and of the intra- and interregional trade networks. For this purpose, the geological origin of the lead used for glazing was studied by measuring the chemical composition of the lead present in the glazes and calculating the isotopic ratios of lead. Thus, it is concluded that the lead of the translucent glazes from Zamora province was exploited in the Linares-La Carolina and/or Alcudia areas.

Keywords: archaeometry; pottery; glaze; lead; isotopes; LA-ICP-MS

1. Sarrera eta motibazioa

Orokorrean, proiektu honetan, Iberiar Penintsulako Erdi Aroko, Aro Modernoko eta Aro Garaikideko zeramika aztertzen da, orduko merkataritzari, artefaktuen banaketa-fluxuari eta eskualde barneko zein eskualdeen arteko merkataritza-sareei buruz sakon ikertzeko asmoz. Material arkeologiko guztiek bi alderdi osagarri erakusten dituzten kontzeptuan oinarritzen da ikerketa: materiala eta kulturala (Buxeda i Garrigós, 2008; Fowler et al., 2019; Glascock, 2016; Roux, 2019). Alde batetik, alderdi materialak zeramikaren berezko ezaugarriak erakusten ditu, konposizio kimiko jakina duten material geologiko gisa. Bestalde, zeramikaren dimentsio kulturala aldaketa sozial, ekonomiko eta politikoen adierazle kronologiko eta kultural gisa izan dezakeen eragina da. Ildo horretan, zeramikak lotura estua du ekoiztu eta kontsumitu zen testuinguruarekin (Fowler et al., 2019), izan ere, zeramikek lehengaien eraldaketa bat jasaten dute artefaktu bilakatzeko. Arkeologian, tradizionalki, zeramiken dimentsio kulturalari buruzko

ikerketa, haien propietate morfologikoen, pastaren kolorearen eta dekorazio ezaugarrien araberako sailkapenetan oinarritu izan da. Honi bere balioa aitortuz eta gutxietsi gabe, kasu batzuetan ezaugarri horien azterketa soilik ez da nahikoa, batez ere, zati txikiak kontserbatzen dituzten zeramikei dagokienez, askotan dekoraziorik edo tipologia argirik gabe. Beraz, sarritan, arkeologian sortzen den galdera ugari erantzunik gabe gelditzen da informazio faltaren eraginez. Gure ikerketan, zeramikariek zer lehengai mota erabili zituzten, tresnaren erabileraren arabera (mahai-tresneria, garraioa...) lehengai mota hainbat erabili ote zituzten, zeramiken jatorria zein zen, zeramika horien banaketa-fluxurik ba ote zegoen, etab. argitzen saiatzen gara. Galdera hauek zeramikariek erabilitako teknologiari, materialaren jatorriari eta merkataritza-sareei buruzkoak dira oro har, hau da, materialen alderdi kulturalarekin lotura duten galderak dira eta ezin dira behaketaz jasotzen den informazioarekin soilik erantzun. Zeramikek daramaten informazio kultural hori haien dimentsio materialari esker ezagutu dezakegu (Buxeda i Garrigós and Madrid i Fernández, 2017; Buxeda i Garrigós et al., 1995; Neustupny, 1971). Horregatik, zeramika arkeologikoaren azterketaren metodologia zeharkako eta diziplina anitzeko planteamendu batean kokatzen da, ikuspuntu arkeologiko, arkeometriko, kimiko zein geologikotik ikertzaileen arteko elkarrizketa sustatuz.

Zeramikaren tipologiari dagokionez, zeramika bi kategoria orokorretan sailkatzen da: sinpleak eta konplexuak. Zeramika sinpleek ez dute estaldurarik erakusten, berriz, zeramika konplexuek apaindurak, beiratuak edota engobeak eduki ditzakete. Antzinatik erabiltzen da beruna zeramikaren beiratuak egiteko osagai nagusi gisa. Berunak urgarriaren funtzioa betetzen du beiratuan (Rice, 2015), hau da, beiratuaren osagaien urtze tenperatura jaisten du, eta normalean galenatik (PbS) eskuratzen da, baina litargiriotik (PbO), berun gorritik (Pb_3O_4), zerusitatik ($PbCO_3$) edota berun zuritik ($2PbCO_3 \cdot Pb(OH)_2$) ere lor daiteke (Tite et al., 1998; Wolf et al., 2003). Berunezko ohiko beiratua berunezko konposatuen eta silizearen hauts-nahasteaz egina dago. Nahaste hau zeramikan aplikatuz gero, beiratu zeharrargia lortuko litzateke. Nahaste honi beste partikula batzuk ere gehi dakizkioke, beste mota bateko beiratuak lortzeko; esate baterako, kasiterita (SnO_2) gehitzea oso ohikoa da eztainu-berunezko beiratu zuri opakoak lortzeko. Tradizionalki, beiratu mota ugari badago ere, Iberiar penintsulan, silizea, beruna eta metal oxidoak nahasiz lortutakoak dira ohikoenak (Calparsoro, 2019) (1. irudia).

1. irudia. Beiraztatu gabeko eta beiratu zeharrargidun eta zuri opakodun zeramikak.

Iberiar Penintsulan, Zamora da zeramikaren ekoizpenean ibilbide luzea duen probintzietako bat. Zamora hirian, Olivares lantegia da ekoizpen-zentro garrantzitsuenetako bat, Zamora hiriko kanpoaldean, Duero ibaiaren ertzean, kokatzen dena eta Aro Modernotik XX. mende hasierara arte indarrean egon dena (Piñel, 1993; Sanz et al., 2005). Zamorako zeramikak lotura estua mantentzen du Gaztelako Erdi Aroko zeramikaren tradizioarekin, batez ere formari dagokionez, maiz erakusten baititu forma irekiak, hala nola platerak eta ontziak, baita itxiak ere, sukaldeko lapikoak bezalakoak (Larrén, 1991; Sanchez-Garmendia et al., 2020; Villanueva Zubizarreta, 2011). Historian zehar hiri eta probintzia honetako artisauek kaltziodun zeramikak (CaO kontzentrazioa > % 5), kaltzio eduki baxuko zeramikak (CaO kontzentrazioa < % 5) eta

zeramika mikatsuak egin dituzte (Sanchez-Garmendia et al., 2020). Banaketa hau zeramikari emango zitzaion funtzionaren araberakoa da. Ontzi horien artean beiratu gabekoak eta beiraztatutakoak aurki daitezke, azken hauek zuri opakoak edota zeharrargiak izanik (Limpo y Llofriu et al., 1989; Rice, 2015; Sanchez-Garmendia et al., 2020). Kaltziodun zeramikei, kolore beixekoak izan ohi direnez, beiratu zuri opakoa gehitu ohi zaie. Bestalde, kaltzio eduki baxuko zeramikak gorriak izan ohi dira eta hauei, beiraztatzekotan, beiratu zeharrargia aplikatzen zaie. Zeramika mikatsua, aldiz, sukaldaritzan erabili ohi da, eskaintzen dituzten propietate termikoei esker. Arrazoi hauengatik, Zamorako zeramika historian zehar eta gaur egun esportatu izan da (Iñañez et al., 2018; Solaun, 2005).

2. Arloko egoera eta ikerketaren helburuak

Lan honetan aztertutako zeramika multzoa hainbat formako Zamorako beiraztatutako 24 zeramikek osatzen dute, hala nola pitxarrak, ontziak eta platerak, batzuk aipatzearren (1. taula). 24 artikulu hauek Zamora probintziako hiru udalerritan ekoitzi ziren; horietatik 20 Zamora hiriko Olivares ekoizpen-zentroan (Iñañez et al., 2018; Sanchez-Garmendia et al., 2018, 2020), eta lau Toron (Larrén, 1991). Olivaresen ekoiztutako 20 zeramika Zamorako hainbat gune arkeologikotan berreskuratu ziren: 9 (XIX-XX. mendeetakoak) Olivares lantegian bertan (Iñañez et al., 2018), 3 (1 XVI. mendekoa eta 2 XVII-XVIII. mendeetakoak) gaur egun hiriko Museo Etnografikoa dagoen lekuan (1583. urtean kartzela izan zena) (Sanchez-Garmendia et al., 2020) eta beste 4 (XV-XVI. mendeetakoak) orain liburutegia dagoen lekuan (lehen *Concepción* eliza izan zena). Gainerako lauak, Benavente hirian berreskuratutakoak, XVII-XVIII. Mendeetakoak dira. Bestalde, Toron ekoitzitako 4 zeramikatatik 1 *Cuesta del Negrillo 11* izeneko lantegian berreskuratu zen eta XVI. mendekoa da, eta kronologia ez ezaguneko beste hirurak, aldiz, *Cuesta del Mataderon*.

1. taula. Zeramika bakoitzaren ezaugarriak (forma, ekoitzi zen lantegia, berreskuratua izan zen leku arkeologikoa, kronologia eta beiratu mota). (e/e= ez ezaguna)

Zeramika	Forma	Lantegia	Leku arkeologikoa	Kronologia	Beiratu mota
BNV001	Katilua	Olivares	Casa del Tinte, Benavente	XVII-XVIII	Zuri opakoa
BNV002	Platera	Olivares	Casa del Tinte, Benavente	XVII-XVIII	Zuri opakoa
BNV003	Katilua	Olivares	Casa del Tinte, Benavente	XVII-XVIII	Zuri opakoa
BNV004	Pixontzia	Olivares	Casa del Tinte, Benavente	XVII-XVIII	Zuri opakoa
TOR002	e/e	Toro	Cuesta del Negrillo 11, Toro	XVII	Zeharrargia
TOR010	Pitxarra	Toro	Cuesta del Matadero, Toro	e/e	Zeharrargia
TOR011	Estalkia	Toro	Cuesta del Matadero, Toro	e/e	Zeharrargia
TOR012	Kikara	Toro	Cuesta del Matadero, Toro	e/e	Zeharrargia
ZMR002	Platera	Olivares	Olivares, Zamora	XIX-XX	Zuri opakoa
ZMR005	Platera	Olivares	Olivares, Zamora	XIX-XX	Zuri opakoa
ZMR008	Katilua	Olivares	Olivares, Zamora	XIX-XX	Zuri opakoa
ZMR012	Ontzi handia	Olivares	Olivares, Zamora	XIX-XX	Zeharrargia
ZMR024	Lapikoa	Olivares	Olivares, Zamora	XIX-XX	Zeharrargia
ZMR025	Lapikoa	Olivares	Olivares, Zamora	XIX-XX	Zeharrargia
ZMR029	Ontzi txikia	Olivares	Olivares, Zamora	XIX-XX	Zeharrargia
ZMR032	e/e	Olivares	Olivares, Zamora	XIX-XX	Zeharrargia
ZMR035	Kirtena	Olivares	Olivares, Zamora	XIX-XX	Zeharrargia
ZMR045	Katilua	Olivares	Concepción, Zamora	XV-XVI	Zuri opakoa
ZMR046	Katilua	Olivares	Concepción, Zamora	XV-XVI	Zuri opakoa
ZMR047	Katilua	Olivares	Concepción, Zamora	XV-XVI	Zuri opakoa
ZMR048	Platera	Olivares	Concepción, Zamora	XV-XVI	Zuri opakoa

ZMR052	Katilua	Olivares	Museo Etnografikoa, Zamora	XVI	Zuri opakoa
ZMR053	Katilua	Olivares	Museo Etnografikoa, Zamora	XVII-XVIII	Zuri opakoa
ZMR055	Platera	Olivares	Museo Etnografikoa, Zamora	XVII-XVIII	Zuri opakoa

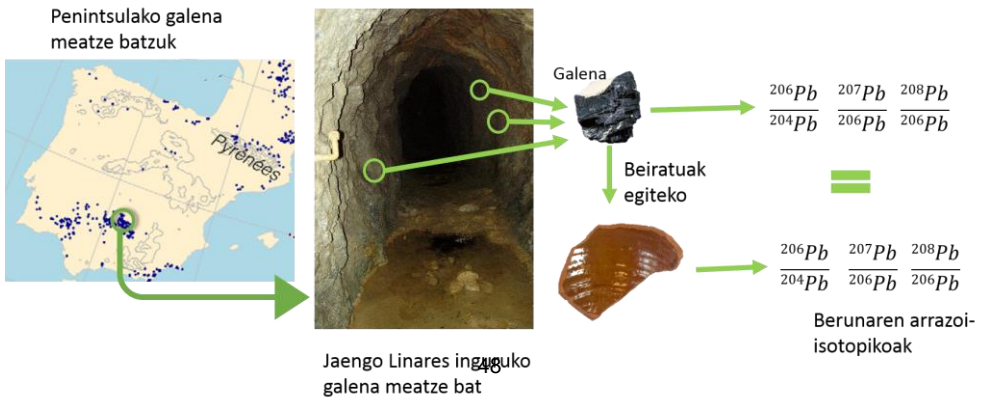
Lan honen helburua Zamorako zeramikariek beiratuak egiteko erabiltzen zuten galenaren iturria zein den jakitea da, alde batetik, eltzegileek ontziak egiteko erabiltzen zuten teknika eta teknologia sakonago ezagutzeko (adib. ontzi motaren arabera leku desberdinetako galena erabiltzen ote zuten, leku desberdinetako galena nahasten ote zuten) eta, bestetik, Zamorak izan zituen merkataritza-sareei buruz ezagutza gehiago eskuratzeko.

Ikerketa ugari egin da metalezko aztarna arkeologikoen jatorriaren arloan, lehengaien jatorri geologikoa ezagutzeko asmoz (Montero-Ruiz, 2018). Ikerketa horien artean, eta batez ere lan honetarako, interes handiko arloetako bat berunezko beiratuak aztertzea da, berunaren balizko jatorria argitzeko helburua duena, ondoren, balizko merkataritza-bideak iradokitzeko (Sabine, 2007; Speakman et al., 2002). Beiratuen jatorriari buruzko arkeometriako egoerari dagokionez, badaude, adibidez, Wolf eta kolaboratzaileek (2003) eta Marzok eta kolaboratzaileek (2007) argitaratutako lanak. Lehenengo ikerketan, egileek Fustateko (Egipto) eztainu-berunez beiraztatutako 48 zeramika islamiar aztertu zituzten TIMS (*Thermal Ionization Mass Spectrometry*) bidez. TIMSek zehaztasun maila altuko analisiak egitea ahalbidetzen du baina lagin prestaketa motela eta neketsua da. Bestalde, azken lanean, egileek Aragoiko XI-XVI. mendeetako beiraztatutako 12 zeramika aztertu zituzten ICP-MS (*Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry*) erabiliz. Gainera, beiratuak egiteko erabilitako berunaren jatorria LA-ICP-MSren bitartez ikertu da Iñañezek eta kolaboratzaileek (2010, 2016) egindako lanetan. Lehen lanean, Romita zeramikaren beiratuetako Pb-ren arrazoi-isotopikoak Erdi- eta Hego-Ameriketako eta Europako datuekin alderatu ziren, berun mineralen jatorri geologikoa argitzeko. Horrela ondorioztatu zen Romitaren berunaren jatorria Mexikon zegoela (Iñañez et al., 2010). Bigarren lanean, Panamako eztainu-berunezko zeramika beiraztatuak egiteko erabilitako berunaren jatorria ikertu zen, zeramika batzuen berunaren jatorria Andeetan egonik eta beste batzuena Espainian (Iñañez et al., 2016).

3. Ikerketaren muina

Beiratuak egiteko eltzegileek erabiltzen zuten berunaren jatorri geologikoa “berunezko mineral arrunt” gisa ezagutzen diren galena (PbS), zerusita ($PbCO_3$) edo anglesita ($PbSO_4$) bezalako mineralen berunaren arrazoi-isotopikoak neurtuz ezagutu daiteke. Hau posible da berunezko mineral arrunt horien arrazoi-isotopikoek konstante izaten jarraitzen dutelako denboran zehar (Hunt, 2003). Berunak isotopo ez erradiogeniko bat (^{204}Pb) eta hiru isotopo erradiogeniko (^{206}Pb, ^{207}Pb eta ^{208}Pb) ditu, uranioaren eta torioaren azken desintegrazio produktuak direnak; ^{206}Pb ^{238}U-tik desintegratu da, ^{207}Pb ^{235}U-tik eta ^{208}Pb ^{232}Th-tik. Berunezko mineral arruntek U/Pb arrazoi-isotopiko txikia dutenez, Pb-ren konposizio isotopikoa gutxi aldatzen da edo ez da aldatzen denborarekin. Horrek berunezko mineralaren iturriaren adina neurtzeko aukera ematen du (Dickin, 2018). Beraz, beiratuak egiteko erabilitako galenaren arrazoi-isotopikoa bere iturriaren berdina izango litzateke (2. irudia). Horregatik, zenbait iturritako galenaren berunaren arrazoi-isotopikoen datu-basea eta gure zeramiken beiratuen berunaren arrazoi-isotopikoak konparatuz, berun mineralaren iturri geologikoa eta, kasurik onenean, meategi zehatza jakitea posiblea litzake.

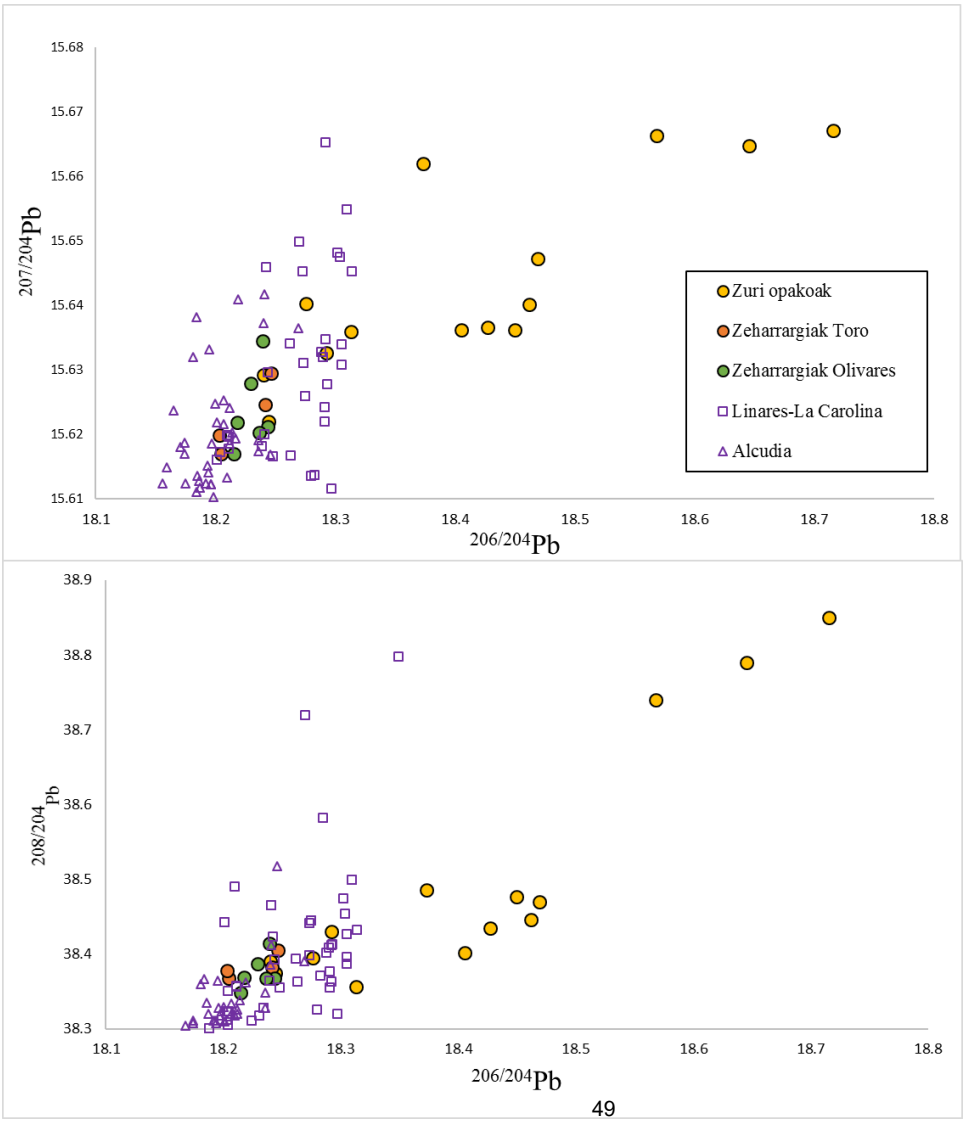
2. irudia. Ikerketaren muina azaltzen duen eskema.



Hala ere, zenbait kontsiderazio hartu beharko lirateke kontuan. Horietako bat da meategi edo eremu geologiko ezberdinek, adin berekoak direnean, berunaren konposizio isotopiko bera erakutsi dezaketela; ondorioz, baliteke material arkeologikoen eta eremu geologikoen edo meategien arteko bat etortzea behin betikoa ez izatea (Hunt, 2003; Santos Zalduegui et al., 2004). Bestalde, lehengaien nahasketa beti kontuan hartu beharreko aukera da. Kasu horretan, material arkeologikoaren konposizio isotopikoa lehengaien konposizio isotopikoen arteko tartean aurkeztuko litzateke (Hunt, 2003). Arazo horiek gutxitzeko, beharrezkoa da meategiei eta zona geologikoei buruzko informazio zabala edukitzea, meategiak ustiatu ziren garaiari buruzko informazioa edukitzeaz gain (Santos Zalduegui et al., 2004; Stos-Gale et al., 1995). Gainera, garrantzitsua da Iberiar penintsulan edo beste kontinente batzuetan egon ziren inportazio-esportazio merkataritza-bideak ezagutzea.

Gure helburura iristeko, lehenengo, beiratuen artean desberdintasunik ba ote dagoen aztertu da, kronologia, forma edota lantegiei dagokienez. Hori beiratuen berunaren arrazoi-isotopikoen arteko konparaketaren bidez egin da. Gero, gure laginen eta datu-baseko galenen berunaren arrazoi-isotopikoen arteko konparaketa egin da. Arrazoi hauek laginaren konposizio kimikoa neurtzen duen (MC)-LA-ICP-MS (*(Multi Collector)-Laser Ablation-Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry*) tresnaren bidez neurtu dira. Lagin bakoitzeko hiru neurketa egin dira eta emaitzak homogeneoak izan dira. Tresna hau erabiltzeko arrazoiak lagina aldez aurretik prestatu behar eza eta analisien azkartasuna eta zehaztasuna dira (Iñañez et al., 2016). Zeramika bakoitzaren beiratuaren berunaren arrazoi-isotopikoak grafikoki 3. irudian ikus daitezke.

3. irudia. Zeramiken beiratuen emaitzak aurkezten dituzten grafikoak. Goiko grafikoak $^{207/204}$Pb VS $^{206/204}$Pb emaitzak azaltzen ditu eta behekoak $^{208/204}$Pb VS $^{206/204}$Pb.



Irudian argi ikusten da orokorrean zeramikek beiratuetan duten beruna ez dela jatorri berdinekoa, puntuak grafikoan zehar banatuta agertzen direlako eta gehienek ez dutelako leku berean bat egiten. Hala ere, bi joera antzeman daitezke: batetik, beiratu zuri opakoen laginak oso dispertsatuta ageri dira grafikoan, eta horrek lagin haien artean desberdintasun handiak daudela iradokitzen du. Bestetik, Zamorako Olivares lantegian eta Toron egindako zeramiken beiratu zeharrargiak bata bestearengandik oso gertu daude eta horrek berunek jatorri bera eduki dezaketela iradokitzen du. Gainera, datu-baseko galenen berunen datuetatik Linares-La Carolina inguruko eta Alcudiako (Jaen) galenei dagozkienak dira gure beiratu zeharrargien laginekin bat datozen bakarrak. Datu hauekin ere bat egiten dute Olivaresen ekoiztutako 5 zeramika zuri opakok, zehazki Olivaresen berreskuratutako hiruk (ZMR002, ZMR005, ZMR008), Museo Etnografikoan berreskuratutako batek (ZMR053) eta, azkenik, Benaventen berreskuratutako beste batek (BNV003). Tornosek (2003) bere lanean azaltzen du, Espainia XVIII-XIX. mendeetan, kobre, pirita eta berun ekoizle nagusia bihurtu zela munduan. Garai horretako Espainiako mineral horien meategi garrantzitsuenen artean aurkitzen ziren Linares-La Carolinako meategiak (1880-1970) (Tornos, 2003). Datu horrek gure XIX-XX. mendeetako laginek Linares-La Carolinako galenekin bat egitea azaldu dezake. Hala ere, XVII-XVIII. mendeetako 3 laginek (BNV003, ZMR053 eta TOR002) datu horiekin bat egiten dutenez, XVII. mendeko zeramikak ere Linares-La Carolinako berunarekin beiraztatu izana posible dela iradokitzen dute. Hipotesi hau Sánchezek (1989) sostengatzen du, XVI. mendearen lehen erdialdean jada Linares-La Carolinako meategietako beruna ustiatzen zela dokumentatzen baitu. Leku horretan galena ekoizten zuten nagusiki, eta bere ekoizpena XVI. mende amaiera arte baliabide urriak zituzten meatzarien esku egon omen zen eta eltzegintzara bideratzen zen.

4. Ondorioak eta etorkizunerako planteatzen den norabidea

Jasotako informazio eta datu guztiekin ondoriozta daiteke leku berdinetik ekarritako galena erabiltzen zutela eltzegileek Zamorako zeramiken beiratu zeharrargiak egiteko. Gainera, Linares-La Carolinako eta Alcudiako meategietako galenaren datuekin bat egiteak eta gehienak XIX-XX. mendekoak izateak iradoki dezake garai hartan inguru horietan Espainia eta beste lurraldeak hornitzeko adina galena ekoizten zela, bibliografian ikusi den bezala (Sánchez, 1989; Tornos, 2003). Ordea, zeramika zuri opakoak egiteko, baliteke leku ezberdinetako galena nahastu izana, XV-XVIII. mendeetan ekoizpena txikiagoa baitzen. Beiratu zuri opakoen dispertsioak iradoki dezake nahasteak ez zirela homogeneoak.

Bestalde, lortutako emaitzek eta bibliografiako datuek adierazten dute XVII-XIX. mendeetako Toro eta Olivares lantegietako beiratu zeharrargi eta zuri opako batzuentzat oso probablea dela Linaresen edota Linares-La Carolina eta Alcudia eremuetan kokatutako meatzeetan ustiatutako galena erabili izana. Hala ere, aipatu bezala, beharrezkoa da meategiei eta zona geologiko ezberdinei buruzko informazio zabala edukitzea beiratuen berunaren jatorria egoki aztertzeko. Gainera, beiratu zuri opakoen dispertsioa sakonago ikertu behar da. Beraz, ondorioak zehazten joateko, Zamoran XV-XIX. mendeetan aktibo zeuden berun minak aztertzea da lan honen hurrengo pausua, datu-basean ez baitugu Zamorako meategietako galenen daturik. Horretarako, Zamorako 5 meategi desberdinetako galenak analizatuko ditugu (MC)-ICP-MS bidez eta, gero, datu hauek gure laginekin konparatuko ditugu bat egiten duten edo ez ikusteko, eta horren arabera, ondorio egokiak ateratzeko.

5. Erreferentziak

Buxeda i Garrigós, J. (2008): Revisiting the compositional data. Some fundamental questions and new prospects, in *Archaeometry and Archaeology. Proceedings of CODAWORK08 The 3rd Compositional Data Analysis Workshop*, University of Girona, Girona, Spain, 1–18.

Buxeda i Garrigós, J., Cau, M., Gurt, J. M., and Tuset, F. (1995): Análisis tradicional y análisis arqueométrico en el estudio de las cerámicas comunes de época romana. *Monografies Empuritanes*, 8, 39–60,.

Buxeda i Garrigós, J. and Madrid i Fernández, M. (2017): Designing Rigorous Research: Integrating Science and Archaeology, in A. Hunt (arg.), *The Oxford Handbook of Archaeological Ceramics, chapter Part II. R*, Oxford University Press, Oxford, 19–47.

Calparsoro, E. (2019): *Transdisciplinar methodologies on Medieval and Post-Medieval pottery analysis: an archaeometric approach to Basque and Riojan Productions*. Doctoral Thesis

Dickin, A.P. (2018): *Radiogenic Isotope Geology*, Cambridge University Press. DOI: https://doi.org/10.1017/9781316163009.

Fowler, K. D., Middleton, E., Fayek, M. (2019): The human element: discerning the effects of potter's behavior on the chemical composition of ceramics, *Archaeological and Anthropological Sciences*, 11, 1, 171–198.

Glascock, M. D. (2016): *Compositional Analysis in Archaeology*. Oxford Handbooks Online, Oxford, 1–25.

Hunt, M. (2003): *Prehistoric Mining and Metallurgy in South West Iberian Peninsula*. BAR International Series 1188, Oxford.

Iñañez J.G., Bellucci, J.J., Rodríguez-Alegría, E., Ash, R., McDonough, W.F., Speakman, R.J. (2010): Romita pottery revisited: a reassessment of the provenance of ceramics from Colonial Mexico by LA-MC-ICP-MS, *J. Archaeol. Sci*, 37, 2698–2704.

Iñañez J.G., Bellucci, J.J., Martín, J.G., Ash, R., McDonough, W.F., Speakman, R.J. (2016): Pb Isotopic Composition of Panamanian Colonial Majolica by LA-ICP-MS, in L. Dussubieux, M. Golitko, B. Gratuze, (arg.), *Recent Advances in Laser Ablation ICP-MS for Archaeology*, Chicago.

Iñañez, J.G., Sanchez-Garmendia, U., Calparsoro, E., Arana, G. (2018): Zamora and the pottery from Olivares workshops: long-tradition pottery manufacturing in the heart of Spain. In *42nd International Symposium on Archaeometry ISA 2018*, Ruvalcaba, José Luís, Mexico, 166.

Larrén Izquierdo, H. (1991): Fondos cerámicos marcados procedentes de Zamora, *Boletín de Arqueología Medieval*, 5, 167–179.

Limpo y Llofriu, A., García-Reyes, C.J., Vicente, S. (1989): Alfarería popular de Toro, *Anuario del Instituto de Estudios Zamoranos Florián de Ocampo*, 6, 15-91.

Marzo, P., Laborda, F., Pérez-Arantegui, J. (2007): A Simple Method for the Determination of Lead Isotope Ratios in Ancient Glazed Ceramics Using Inductively Coupled Plasma-Quadrupole Mass Spectrometry, *Atomic Spectroscopy*, 28, 6.

Montero-Ruiz, I., (2018): La procedencia del metal: consolidación de los estudios con isótopos de plomo en la Península Ibérica, *Revista d'Arqueologia de Ponent*. 28, 313-330. DOI: 10.21001/rap.2018.28.17

Neustupny, E. (1971): Whiter Archaeology?, *Antiquity*, 45, 34–39.

Piñel, C. (1993): Cerámica producida en el Alfar de Olivares. Edad Moderna. Iglesia de Santo Tomé, in: *Civitas*, MC Aniversario de la Ciudad de Zamora, Catálogo de la exposición, Zamora, 212–213.

Rice, P. M. (2015): *Pottery analysis: a sourcebook*, University of Chicago Press, Chicago.

Roux, V. (2019): *Introduction to Ceramic Technology. In Ceramics and Society*, Springer, Berlin, 1–14.

Sabine, J. (2007): *Inorganic Mass Spectrometry, Principles and Applications*, England.

Sánchez, J., (1989): *De Minería, metalúrgica y comercio de metales. La minería no férrica en el Reino de Castilla 1450-1610*, Salamanca.

Sanchez-Garmendia, U., Calparsoro, E., Arana, G., Iñañez, J.G. (2018): Beneath sacred land: glazed pottery from the old church of La Concepción in Zamora, in: *GlazeArt2018* Lisbon, Lisbon, 361–379.

Sanchez-Garmendia, U., Calparsoro, E., Morillas, H., Arana, G., Iñañez, J.G. (2020): Pottery from the Ethnographic Museum archaeological site of Zamora: an archaeometric approach, *Journal of Archaeological Science Reports*, 33, DOI: https://doi.org/10.1016/j.jasrep.2020.102514

Sanz, F.J., Misiego, J.C., Marcos, G.J., Martín, M.A., Fernández, E., García, M.I. (2005): La actividad artesanal en el barrio de Olivares de Zamora. Los Hallazgos en el solar de la Plaza de San Claudio, 6 c/v a la Calle Mediodía, 2. *Anuario 2005 del Instituto de Estudios Zamoranos "Florián de Ocampo"*, 22, 229–240.

Santos Zalduegui, J.F., García de Madinabeitia, S., Gil Ibarguchi, J.I. (2004): A lead isotope database: the Los Pedroches–Alcudia area (Spain); implications for archaeometallurgical connections across southwestern and southeastern Iberia, *Archaeometry*, 46, 4, 625-634.

Solaun, J.L. (2005): *Erdi Aroko zeramika Euskal Herrian (VIII.-XIII. Mendeak): ekoizpenaren sistematizazioa, bilakaera eta banaketa*, Eusko Jaurlaritzaren argitalpen zerbitzu nagusia.

Speakman, R., Neff, H., Glascock, M., Higgins, B. (2002): Characterization of Archaeological Materials by Laser Ablation-Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry, in: K.A Jakes (arg.). *Archaeological Chemistry, Materials, Methods and Meaning*, Washington. DOI: 10.1021/bk-2002-0831.ch005.

Stos-Gale, Z., Gale, N.H., Houghton, J., Speakman, R. (1995): Lead isotope data from the Isotrace Laboratory, Oxford: ARCHAEOMETRY data base 1, ores from the Western Mediterranean, *Archaeometry*, 37, 2, 407-415.

Tite, M.S., Freestone, I., Mason, R., Molera, J., Vendrell-Saz, M., Wood, N. (1998): Lead glazes in antiquity—methods of production and reasons for use, *Archaeometry*, 40, 241–260. https://doi.org/10.1111/j.1475-4754.1998.tb00836.x.

Tornos, F. (2003): *Base metal deposits in Spain: mineralization in a diversity of environments*. Irish Association for Economic Geology.

Villanueva Zubizarreta, O. (2011): *La Ollería y alcallería en la cuenca del Duero a lo largo de la Edad Media y Moderna*, Manual de Cerámica Medieval y Moderna, Museo Arqueológico Regional, Madrid.

Wolf, S., Stos, S., Mason, R., Tite, M.S. (2003): Lead isotope analyses of Islamic pottery glazes from Fustat, EgypT, *Archaeometry*, 45, 3, 405–420. https://doi.org/10.1111/ 1475-4754.00118.

6. Eskerrak eta oharrak

Ikerketa hau Espainiako Ekonomia, Industria eta Lehiakortasun Ministerioak (MINECO/AEI/ERDF, UE) finantzatutako CERANOR-2 (HAR2017-84219-P) proiektuaren baitan kokatzen da. USGk eskerrak eman dizkio Euskal Herriko Unibertsitateari (UPV/EHU) Ikertzaileak Prestatzeko Kontratazio Deialdiako (2017) PIF2017/153 laguntza jaso izanagatik. Bestalde, JGIk Espainiako Ekonomia, Industria eta Lehiakortasun Ministerioari eskerrak ematen dizkio Ramon y Cajal kontratuagatik (RYC-2014-16835). Egileek Estokolmoko Naturhistoriska Riksmuseet-eko Geologia Departamentuari eskerrak eman nahi dizkie, ikerketa honen zati handi bat bertako instalakuntzetan burutzeko aukera eman izanagatik eta baita EHUri ere, Estokolmoko Naturhistoriska Riksmuseet-en 3 hilabeteko egonaldia egiteko MOV19/55 diru-laguntza eman izanagatik.

Gaur egungo ikerketa geologiko baten nondik norakoak: Kretazeoko hiperestentsioari loturiko hidrotermalismoaren zantzuak Euskokantauriar arroan

Ladron de Guevara, M.[1], Bodego, A.[1] eta Iriarte, E.[2]

[1] Geologia Saila. Zientzia eta Teknologia fakultatea (UPV/EHU), [2] Laboratorio de Evolución Humana, Dpto. de Historia, Geografía y Comunicación. Universidad de Burgos

Laburpena

Denboraren poderioz ikerketa geologikoak asko aldatu dira. Metodologia berriek jakintza geologikoa nabarmen hobetu dute azken urteotan, duela milioika urte gertatutako prozesuak zehaztasun handiarekin ezagutzera iritsi arte. Kretazeoko Euskokantauriar arroko *rifting*ari buruz, ordea, badaude ziurgabetasun ugari. Arro horretako garai hartako hidrotermalismoa azterturik, azkenaldian bolo-bolo dabilen hiperestentsioa deritzon ereduaren bideragarritasuna aztertzen ari da. Kartografia geologikoan, azterketa petrologikoan eta beste hainbat tekniketan oinarrituriko Kretazeoko hiperestentsioari buruzko gaurko ikerketa geologiko baten nondik norakoak aurkeztea du helburu lan honek.

Hitz gakoak: hiperestentsio, hidrotermalismo, Kretazeoa, *rifting*, Euskokantauriar arro.

Abstract

Over time, geological research has changed deeply. New methodologies have greatly improved geological knowledge in recent years to the point of knowing with great precision the processes that took place millions of years ago. However, there are many uncertainties about theCretaceous rifting of the Basque-Cantabrian Basin. By analysing the hydrothermalism of this basin at that time, it is being studied the viability of a model that has recently become known as hyperextension. The aim of this work is to show the keys to a current geological study related to the Cretaceous hyperextension, based on geological cartography, petrological studies and other techniques.

Keywords: hyperextension, hydrothermalism, Cretaceous, rifting, Basque-Cantabrian Basin.

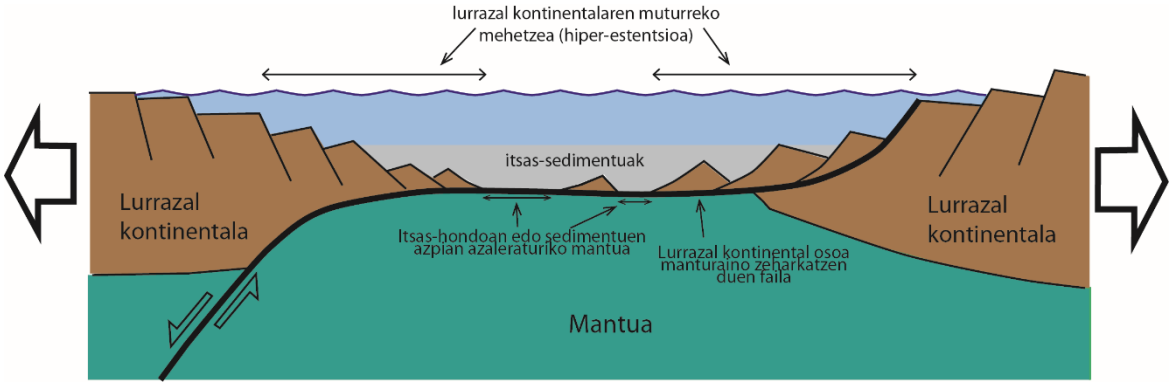
1. Sarrera eta motibazioa

Natur zientzien ikerketaren baitan hamaika iraultza izan dira historian zehar, modu progresiboan lorturiko datuei esker eraikitako eredu berritzaileen bitartez. Ezagutza geologikoaren baitan ere izan dira azpimarragarriak diren horrelako zenbait gertaera. Esaterako, XVIII. eta XIX. mendeetan James Hutton eta Charles Lyell geologo eskoziarrek uniformismo eta aktualismoaren printzipioak azaldu eta garatu zituzten, oraina ulertzea, iraganean zer gertatu zen jakiteko giltzarria dela ondorioztatuz. Bide beretik, 20. mendearen hasieran Alfred Wegener meteorologo eta geofisikari alemaniarrak kontinenteen jitoaren hipotesia garatu zuen, 50 urteberanduago definituko zen plaken-tektonikaren teoriaren aurrekaria. Hiperestentsioaren ideia (Doré eta Lundin, 2015; Lavier eta Manatschal, 2006; Manatschal, 2004), aipaturiko iraultzen eskalakoa izan gabe, komunitate zientifikora zer esan handia ekarri duen beste hipotesi iraultzaile bat da. Izan ere, luzaroan ikertu den *rifting* deritzon kontinenteen apurketa prozesua hobeto ulertzeko ikuspegi berria iradokitzen du. Hiperestentsioa azken hamarkadetan garatutako hipotesia da. Teknologiak aurrera egin ahala, datu geofisiko, geokimiko eta sedimentologiko berriak txertatzen joan dira azken urteetan garatutako ereduetan (Péron-Pinvidic eta Manatschal, 2019), kontzeptu eta prozesu berriak ezagutu eta ulertzeraino (Clerc et al., 2018; Péron-Pinvidic et al., 2013; Ranero eta Pérez-Gussinyé, 2010; Reston, 2005).

Hiperestentsioari loturiko prozesuen artean gailentzen dena mantuaren azaleratzea izan ohi da (1 irudia). Azaleratze horren bilakaera estentsio-failen jokaerak baldintzatzen du eta, horri loturik, aktibitate hidrotermala handia izan daiteke. Berriki egindako azterketek erakutsi dute hidrotermalismoak garrantzia duela estentsio prozesuetan (Aranburu et al., 2002; Bodego et al., 2018; Corre et al., 2018; Bahnan et al., 2020; Incerpi et al., 2017; Picazo et al., 2019; Pinto et al., 2015; Salardon et al., 2017). Aktibitate hidrotermalaren aztarnak arroketan antzematen dira. Fluido beroek arroken diagenesian eragindako aldaketak aztertuz eta arroka ostalarietako mineralizazioak behatuz, antzinako aktibitate hidrotermala nolakoa izan zen interpretatu daiteke, garaiko eboluzio

geologikoa ezagutuz. Diagenesia, sedimentuek arroka sedimentario bilakatzeraino izatendituzten prozesuen multzoa da. Prozesu hauek sedimentuen trinkotzea, birkristalizazioa, edota zementazioa izan daitezke, esaterako. Diagenesia lurrazalean ematen da, kilometro gutxi batzuen sakonera bitartean, presio eta tenperatura balio jakinen azpitik (250-300 MPa eta 150-200ºC azpitik) eta metamorfismoaren aurretiko fasea dela esan daiteke.

1.irudia. Hiperestentsioaren eredu sinplifikatua (Bodego, 2019 lanetik hartua).



Hiperestentsioarekin lotutako egitura eta prozesuak Alpeak eta Pirinioak bezalako Mesozoiko garaiko alderanzturiko arroetan behatu dira, eta Euskokantauriar arroa (EKA) ez da salbuespen bat. EKAren bilakaera sakonki loturik dagoestentsio- eta transtentsio-esfortzuen menpean Mesozoikoan irekitzen hasi zen Ipar Ozeano Atlantiko eta Bizkaiko Golkoarekin (de Felipe et al., 2017; de Felipe et al., 2018; Ducoux et al., 2019; Tugend et al., 2014). Horregatik, EKAren garai hartako estentsio/hiperestentsioari loturiko eboluzioak interes zientifiko handia du. Eta hori gutxi balitz, estentsioak eta loturiko hidrotermalismoak eragin handia izan zuten garaiko ingurune sedimentarioen bilakaeran eta sedimentazioan. Izan ere, failen aktibitateak sakongune eta goraguneak sortu zituen, eta fluido hidrotermalek, inguruneko uren kimika aldatuz, biotan zein diagenesian eragina izan zezaketen. Gauzak horrela, hiperestentsioaren ereduak leiho berri bat zabaldu dezake EKAren eboluzioa ulertzeko moduan, urteetan komunitatean hedaturiko Kretazeoko riftari buruzko zenbait hipotesi alboratuz eta eboluzio horren baitan iraultza berritzaile bat emanez.

2. Arloko egoera eta ikerketaren helburuak

Esan bezala, azken hamarkadetan mundu osoko hiperluzaturiko hainbat kontinente-ertz egonkor ikertu dira. Horren adibide dira, esaterako, Ozeano Atlantikoko Iberia-Ternua, Angola-Brasil eta Norvegia-Groenlandia ertz egonkor konjugatuak (Péron-Pinvidic et al., 2013; Péron-Pinvidic eta Manatschal, 2010; Unternehr et al., 2010), Australia-Antartika sistema, edota Txina hego-ekialdeko itsasokoa (Gillard et al., 2016; Nirrengarten et al., 2020). Batez ere teknika geofisikoen bitartez lorturiko lurpeko profil sismikoen interpretazioak baimendu du egitura tektonikoen identifikazioa. Egitura horiek interpretatzeak *rifting* eredu berriak plazaratzea ekarri du (Clerc et al., 2018; Manatschal, 2004). Horretaz gain, arroken azterketa petrologikoak eboluzio diagenetikoaren nolakotasuna ezagutzea ere baimendu du. Zentzu horretan, arrokek erakusten dituzten ehunduren analisiek hiperestentsioari eta mantuaren azaleratzeari loturiko prozesu ezberdinen denbora-ordena esleitzea eta arro desberdinetako eboluzio tektono-termikoaestimatzea ahalbidetu dute.

Lan honen helburu nagusia EKAko Bortzirien mazizoko ipar-mendebaldeko eta hegoaldeko Kretazeo garaiko egitura geologikoen eta hidrotermalismoaren karakterizazioa nola egiten ari den azaltzea da. Jarraitzen ari den metodologia zein den azaltzea eta gaur egungo mota horretako ikerketa geologiko bat nola egiten den kontatzea. Metodologia horren xede nagusia arroketan fluido beroen jarduerak sorturiko anomaliak aurkitzea da. Ondoren horiek deskribatu eta prozesu geologikoak ulertuz, gertakarien denbora ordenamendu bat esleitzea. Horrela, garai hartako EKAren estentsio-prozesuei buruz datu gehiago lortuko dira, eta argitaraturiko lanekin konparatuz, Kretazeoko hiperesentsioaren hipotesia balioztatzeko beste leiho bat irekiko da.

3. Ikerketaren muina

Ikerketaren funtsari dagokionez, aipaturikoa bezalako ikerketa bat aurrera eramateko hainbat mugarri gainditu behar dira. Kretazeoko balizko hiperestentsioari loturiko hidrotermalismoa aztertzeko, garai hartako arroketan prozesu hidrotermalek utzitako aztarnak eta anomaliak aurkitzea eta interpretatzea da jomuga (2. irudia). Lan hori xehetasunez kokartografia geologiko batean eta harturiko laginen analisian (azterketa petrologikoa, geokimikoa…) oinarritzen da nagusiki.

3.1. Kartografia geologikoa

Hidrotermalismoari loturiko anomaliak bilatzeko, eremuko geologia ondo ezagutzea funtsezkoa da. Eskala ezberdineko datuak eta behaketak, korrelazionatzea beharrezkoa da. Horretarako, kartografia geologiko egoki bat nahitaezkoa da. Horrek ahalbidetuko baitu arroken eta egitura geologikoen antolaketa espazial zein denbora-ordenamendu egoki baten interpretazioa egitea. Mapa geologiko orokorrak dokumentu zientifiko publikoak izan ohi dira etaerakunde publikoek garatzen dituzte normalean. Horiek, eskala ezberdinetakoak izan daitezke, arruntenak 1:25.000 eta 1:50.000 eskalakoak direlarik. Hala eta guztiz ere, industrian zein ikerketan, kanpaina geologikoak egiten dira datu kartografiko gehiago lortzeko. Mapa horiek egiteko teknika ezberdinak daude. Esaterako, teknika geofisikoek edota zundaketek sakoneko geologia ezagutzeko balio dute eta gainazaleko datuekin bateratuz lurraldeko geologiaren irudi nahiko fidela eman dezakete. Ikerketa honetan, zundaketen eta kanpaina geofisikoen faltan, azaleko behaketetan oinarritutako mapa geologikoak ari dira eraikitzen. Behaketa horiek landan azterturiko azaleramenduetan harturiko datuetan eta laginetan oinarritzen dira, batik bat. Mapa geologikoetako datuek arroken litologia, adina, geruzapenaren orientazioa eta geruzen arteko erlazio geometrikoak, egiturak, eta abar adierazten dituzte, oinarri topografiko baten gainean. Horrela, eremuan azaleratzen diren eta azaleratzen ez diren arroken ordenamendu espaziala interpretatu daiteke hiru dimentsiotan. Eta hori adierazteko, zehar-ebaki geologiko deritzen ebaketak egiten dira norabide jakinetan, aipaturiko arroken eta egituren antolaketaren ideia on bat izateko. Horrekin guztiarekin, arroka unitateen lodierak, alboranzko aldaketak, failen eta tolesen geometriak estimatu daitezke, estentsioaren izaera nolakoa izan zen ezagutzeko. Mapa geologikoak interpretazio-gradu bat dute beti, datu asko ezin baitira lortu. Horregatik, datuak gehitu ahala, mapa geologiko fidelagoak egin daitezke.

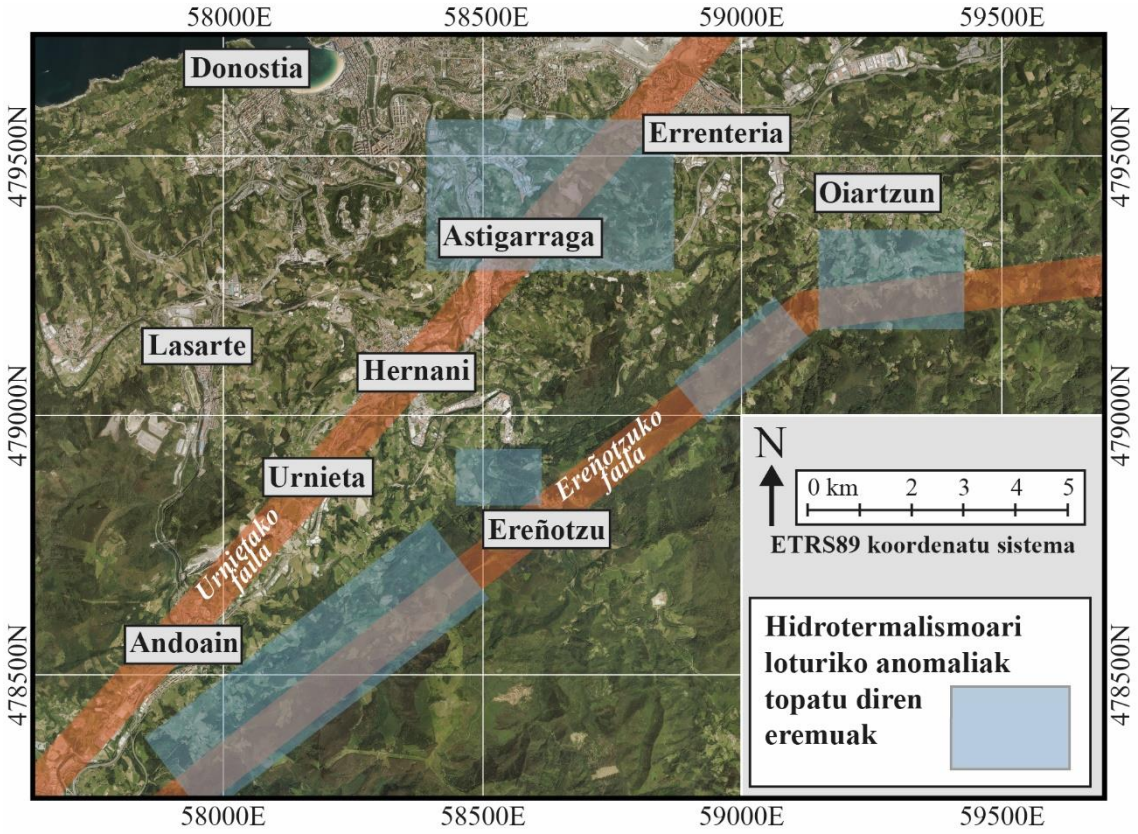
Ikerketa honi dagokionez, orain arte Bortzirien mendiguneko ipar-mendebaldeko eremuan bideratu da landa-lana, eta ondorioz, kartografia geologikoa eta laginketa. Eremu hau Ereñotzuko faila deritzon muga geologikoak baldintzatzen du batez ere, Urnietako failarekin batera (2. irudia). Ereñotzuko faila, gutxi gorabehera, estentsio aurreko arrokak eta, estentsioaren garaikideak eta ondorengoak diren arrokak banatzen dituen eta Villabonatik Oiartzun ekialdera arte luzatzen den muga tektonikoa da. Faila horri loturik, Kretazeoko hidrotermalismoari loturik egon daitezkeen zenbait anomalia aurkitu dira. Esaterako, Kretazeoko karbonatozko arrapaletan eta deltetan metaturiko sedimentu litifikatuetan hausturak, mineralizazioak eta burdinaren mobilizazioari loturiko gorritzeak aurkitu dira, besteak beste.

3.2. Laginen analisia

Laborategiko lanaren harira, laginak teknika ezberdinak erabiliz analizatzen dira. Hasteko, landan harturiko laginen prestaketa baten ostean, arroken xafla meheak mikroskopioan aztertzen dira. Horrela, azterketa petrologikoarekin, begi hutsekin ikusezinak diren ehundurak, mineralak, fosilak eta abar behatu daitezke. Informazio asko atera daiteke mikroskopioaren laguntzaz. Izan ere, xehetasun handiko arroken deskribapen on batek arroka horien sorreraren eta diagenesiaren berri eman dezake. Adibidez, sedimentu horiek metatu zireneko ingurune sedimentarioa zein zen interpretatu daiteke mineralen, fosilen, ehunduraren eta beste zenbait irizpidetan oinarriturik. Fosilen agerpenak eta fosil elkarteek (mikrofosilak nagusiki) arroken datazio erlatiboa egitea baimendu dezakete. Eta hori gutxi balitz, kartografia geologikoa osatzeko oso baliagarria da. Diagenesiari dagokionez, sedimentuek prozesu ezberdinetan izaten dituztenaldaketak argitu dezake. Adibidez, izaki bizidunek jatorrian zuten oskolen edota egituren mineralogia aldaketak antzeman daitezke, inguruneko baldintza fisiko-kimikoen informazioa (tenperatura, pH-a eta presioa, besteak beste) eman dezakeelarik, sakonera erlatibo baten estimazioarekin batera. Azterketa petrologikoa osatzeko beste teknika osagarrien artean, mineralak desberdintzeko xaflen tindaketak egin daitezke,

edota ehundurak desberdintzeko, katodoluminiszentzia erabili. Honez gain, beste hainbat teknika analitiko erabili daitezke. Ikerketa honetan erabili diren eta erabiliko diren tekniken artean, mineralogia orokorra eta buztinen mineralogia ezagutzeko X izpien difrakzioa, elementu nagusien, traza-elementuen eta lur arraroen masa espektrometria, oxigeno eta karbono isotopoenneurketa, inklusio fluidoen termometria eta paleomagnetismoa.

2. irudia. Bortzirien mazizoko ipar-mendebaldeko ikerketa gunea.



4. Ondorioak

Ondorioei dagokienez, bi zatitan banatu daitezke hauek. Hasteko, kartografia geologikoak eta azterketa petrologikoak erakutsi dute Kretazeoko estentsioaren ondoriozko hidrotermalismoari loturiko anomaliak egon daitezkeela Bortzirien mendiguneko ipar-mendebaldean. Kartografiak arroken eta egitura geologikoen antolaketa eta erlazio geometrikoak azaleratu ditu. Horrela, Ereñotzu eta Urnieta failek baldintzaturiko estentsioaren nolakotasunaren datu gehiago lortu diraeta estentsioa baldintzatuko zuten faila horien jokaera ezagutzeko balio dezake etorkizunean. Laborategiko lanak eta, batez ere, azterketa petrologikoak (beste tekniken laguntzarekin), mineral berrien sorrera, burdinaren mobilizazioa, birkristalizazioaren ondoriozko kristalen tamainaren handitzea, haustura sistemak garatzea eta abar, deskribatzea ahalbidetu du. Prozesu horiek hidrotermalismoaren jardueraren ondoriozko emaitza diagenetikoak izan daitezke. Hala eta guztizere, oraindik ezin da prozesu hauek barneratzen dituen hiperestentsioari loturiko eredu bat sortu.

Bestalde, lan honek ikerketa geologikoen diziplina aniztasuna agerian uzten du. Osagarriak diren teknikak eta diziplinak uztartzea nahitaezkoa da horrelako ikerketak aurrera eramateko. Teknologiaren aurrerapenak datu berriak lortzeko gaitasuna eskaintzeaz gain, datu zaharrak berrinterpretatzeko ere balio dezake. Izan ere, urteetan kontinenteen apurketari buruz nagusi izan diren ereduen gaineko hautsak harrotu dira eta hiperestentsioaren ikuspuntu berri honek izango du zer esana.

5. Etorkizunerako planteatzen den norabidea

Esan bezala, ikerketa hau bukatzeko oraindik asko falta da, ikerketaren oinarriak soilikbaitaude ezarrita. Plangintzari dagokionez, orain arte lorturiko eta etorkizunean lortuko diren datuen eta emaitzen arabera, Bortzirien mendiguneko iparraldeko eta hegoaldeko Kretazeoko estentsioari loturiko hiperestentsioan oinarrituriko hidrotermalismoaren eredu bat eraikitzea espero da, gero, EKAra hedatzeko. Horrela, hipotesi berri honek EKAren bilakaeran izan zezakeen eragina ikustea eta balioztatzea posible izango da. Horretarako, lanean zehar aipaturiko tekniketan eta beste hainbat jardueren bitartez, Bortziriak mugatzen duten failen inguruko hidrotermalismoa xehetasun handiz landu beharko da.

6. Erreferentziak

Aranburu, A., Fernández-Mendiola, P. A., López-Horgue, M. A. eta García-Mondéjar, J. (2002), Syntectonic hydrothermal calcite in a faulted carbonate platform margin (Albian of Jorrios, northern Spain), *Sedimentology*, 49, 875-890.

Bahnan, A. E., Carpenter, C., Pironon, J., Ford, M., Ducoux, M., Barré, G., Mangenot, X. eta Gaucher, E. C. (2020), Impact of geodynamics on fluid circulation and diagenesis of carbonate reservoirs in a foreland basin: Example of the Upper Lacq reservoir (Aquitaine basin, SW France), *Marine and Petroleum Geology*, 111, 676-694.

Bodego, A., Aranburu, A., Iriarte, A., López-Horgue, M. A. eta Damas-Mollá, L. (2018), Primerosdatos de hidrotermalismo Cretácico en el margen oriental de la Cuenca Vasco- Cantábrica, *Geogaceta*, 64, 31-38.

Bodego, A. 2019. «Bizkaiko Golkoa, Pirinioak eta plaka-tektonika». URL: https://zientziakaiera.eus/2019/06/06/bizkaiko-golkoa-pirinioak-eta-plaka-tektonika/ (2019ko ekainaren 6a).

Clerc, C., Ringenbach, J. C., Jolivet, L. eta Ballard, J. F. (2018), Rifted margins: Ductile deformation, boudinage, continentward-dipping normal faults and the role of the weak lower crust, *Gondwana Research*, 53, 20-40.

Corre, B., Boulvais, P., Boiron, M. C., Lagabrielle, Y., Marasi, L. eta Clerc. C. (2018), Fluid circulations in response to mantle exhumation at the passive margin setting in the North Pyrenean Zone, France. *Mineralogy and Petrology*, 112(5), 647-670.

Defelipe, I., Pedreira, D., Pulgar, J. A., Iriarte, E. eta Mendia, M. (2017), Mantle exhumation and metarmorphism in the Basque-Cantabrian Basin (N Spain): Stable and clumped isotope analysis in carbonates and comparison with ophicalcites in the North Pyrenean Zone (Urdach and Lherz), *Geochemistry, Geophysiscs, Geosystems*, 18(2), 631-652.

Defelipe, I., Pulgar, J. A. eta Pedreira, D. (2018), Crustal structure of the eastern Basque-Cantabrian zone – western Pyrenees: from the Cretaceous hyperextension to the Cenozoic inversion, *Revista de la Sociedad Geológica de España*, 31(2), 69-82.

Dorè, T. eta Lundin, E. (2015), Hyperextended continental margins—Knowns and unknowns, *Geology*, 43, 95-96.

Ducoux, M., Jolivet, L., Callot, J. P., Aubourg, C., Masini, E., Lahfid, A., Homonnay, E., Caganard, F., Gumiaux, C. eta Baudin, T. (2019), The Nappe des Marbres Unit of the Basque - Cantabrian Basin: The Tectono-thermal Evolution of a Fossil Hyperextended Rift Basin, *Tectonics*, 38, 3881-3915.

Gillard, M., Autin, J. eta Manatschal, G. (2016), Fault systems at hyper-extended crust: Structural style, evolution and relation to magma, *Marine and Petroleum Geology*, 76, 51-67.

Incerpi, N., Martire, L., Manatschal, G. eta Bernasconi, S. M. (2017), Evidence of hydrothermal fluid flow in a hyperextended rifted margin: the case study of the Err nappe (SE Switzerland), *Swiss Journal of Geoscience*, 110(2), 439-456.

Lavier, L. L. eta Manatschal, G. (2006), A mechanism to thin the continental lithosphere at magma- poor margins, *Nature*, 440, 324-328.

Manatschal, G. (2004), New models for evolution of magma-poor rifted margins based on a review of data and concepts from West Iberia and the Alps, *Journal of Earth Science*, 93, 432- 466.

Manatschal, G., Sutra, E. eta Péron-Pinvidic, G. (2010), The lesson from the Iberia-Newfoundlandrifted margins: how applicable is it to other rifted margins?, *Central and North Atlantic Conjugate*

Margins Conference, 2, 27-37.

Nirrengarten,, M., Kusznir, N. J., Sapin, F., Despinois, F., Pubellier, M., Chang, S. P., Larsen, H.C. eta Ringenbach, J. C. (2020), Extension modes and breakup process of the southeast China-Northwest Palawan conjugate rifted margins, *Marine and Petroleum Geology*, 113, 104-123.

Pèron-Pinvidic, G., Manatschal, G. eta Osmundsen, P. T. (2013), Structural comparison of archetypal Atlantic rifted margins: A review of observations and concepts, *Marine and Petroleum Geology*, 43, 21-47.

Pèron-Pinvidic, G. eta Manatschal, G. (2019), Rifted Margins: State of the Art and Future Challenges, *Frontiers in Eartch Science*, 7, 218.

Picazo, S., Lafay, R., Faucheux, V. Eta Vennemann, T. (2019), New constraints on carbonation associated with brecciation in hyperextended margins (example of Iberia and Newfoundland margins), *Terra Nova*, 31(4), 317-331.

Pinto, V. H. G., Manatschal, G., Karpoff, A. M. eta Viana, A. (2015), Tracing mantle-reacted fluids in magma-poor rifted margins: The example of Alpine Tethyan rifted margins, *Geochemistry, Geophysics, Geosystems*, 16(9), 3271-3308.

Ranero, C. R. eta Pérez-Gussinyé, M. (2010), Sequential faulting explains the asymmetry and extension discrepancy of conjugate margins, *Nature*, 468, 294-298.

Reston, T. J. (2005), Polyphase faulting during the development of the west Galicia rifted margin, *Earth and Planetary Science Letters*, 237, 561-576.

Salardon, R., Carpentier, C., Bellahsen, N., Pironon, J. eta France-Lanord, C. (2017), Interactions between tectonics and fluid circulations in an inverted hyperextended basin: Exampleof mesozoic carbonate rocks of the western North Pyrenean Zone (Chaînons Béarnais, France), *Marine and Petroleum Geology*, 80, 563-586.

Tugend, T., Manatschal, G., Kusznir, N. J., Masini, E., Mohn, G. eta Thinon, I. (2014), Formation and deformation of hyperextended rift systems: Insights from rift domain mapping in the Bay of Biscay-Pyrenees. *Tectonics*, 33, 1239-1276.

Unternehr, P., Péron-Pinvidic, G., Manatschal, G. eta Sutra, E. (2010), Hyper-extended crust in the South Atlantic: in search of a model, *Petroleum Geoscience*, 16, 207-215.

7. Eskerrak eta oharrak

Lan hau doktorego tesi baten parte da, bertan garatzen ari diren hipotesi, kontzeptu eta helburuak aurkezten direlarik. Horretaz gain, lan honek UPV/EHU-ko ikertzaileak prestatzeko PIF 19/149 bekaren babesa jaso du, 2020.0113 UPV/EHU-TOTAL ikerketa kontratuaren eta Eusko Jaurlaritzako IT1029-16 ikertalde kontsolidatuaren laguntza ere izan duelarik.

Euskal kostako bi estuarioren osasun egoeren azterketa, organismo zentinela moduan muskuiluak erabilita

San Román Martínez, A.[1,2], Zaldibar Aramburu, B.[2,3]

[a]*Kimika Analitikoa saila,UPV-EHU*
[b]*Itsas Biologia eta Bioteknologia Esperimentalen Ikerketa Zentroa, PiE-UPV-EHU*
[c]*Zoologia eta Animalia Zelulen Biologia saila, UPV-EHU*
annesanroman@gmail.com

Laburpena

Kutsadura-historia desberdina izan duten eta oraindik ere duten Barbadun eta Butroe estuarioetako ur-egoera aztertzeko, bost laginketa-guneko adin ezberdineko muskuiluak erabili ziren. Honela, gonaden analisi histologikoek agerian jarri zuten sasoiarekin lotuta espero ziren heldutasun patroiak, soilik laginketa garaiaren araberako ezberdintasunak erakutsiz. Digestio-guruinaren analisiak, Barbadun estuarioko laginketa-gune batean erakutsi zuen atrofia maila altuena. Autometalografia bidezko zilarrezko hauspeakin beltzen kuantifikazioak agerian utzi zuen metalen presentzia digestio-lisosometan, gune guztietako muskuiluetan, eta bereziki, Barbadun estuarioko Punta Lucero gunean. Kasu honetan, Butroeko muskuilu handienak digestio-guruinean metalak metatzeko joera handiagoa erakutsi zuten. Bestalde, analisi kimikoek Al, Fe eta Zn kontzentrazio altuak erakusten zituzten muskuiluen ehun bigunetan eta Butroeko muskuiluek metal karga handiena izan zuten. Metal/maskor pisuek ez zuten informazio gehigarririk eman. Bestetik muskuiluen tamainak eragin diferentziala izan zuen ehun bigunetan metalak metatzeko gaitasunean, muskuilu txikiak izanik karga metaliko handiagoa zutenak. Maskorren eta digestio-guruinaren oinarrizko konposizioaren analisiak XRFren bidez elementuen banaketa eredu ezberdinak azaldu zituzten, ingurumenaren gaineko aldaketa posibleak ulertzen lagun zezaketenak. Orokorrean, Butroe estuarioan maiatzean ikusitako metal kontzentrazio altuek, eta Barbaduneko laginketa-puntu batzuetan behatutako alterazio patologikoak iradokitzen dute nolabait estuario hauek puntualki bada ere, estres iturrien presentzia nabarmena jasaten dutela.

Hitz gakoak: *Mytilus galloprovincialis,* Euskal estuarioak, metal aztarnak, histopatologia, biomarkatzaileak, analisi kimikoak

Abstract

In order to assess the possible effects of pollutants in two estuaries with different pollution history such as Barbadun and Butroe, mussels from five monitoring stations were collected as sentinel organisms. Gonad histological analyses revealed the expected seasonally related sexual pattern which was only affected by sampling season. Digestive gland analyses revealed slightly higher levels of atrophy in Barbadun. Black silver deposit quantification revealed the presence of metals in digestive lysosomes of mussels from all stations, especially in mussels from Barbadun. In this case, larger mussels from Butroe tended to accumulate more metals in digestive gland. On the other hand, chemical analyses revealed substantially high concentrations of Al, Fe and Zn in mussel soft tissues. Mussels from Butroe estuary had the highest metal burden. Metal/shell weight indices did not show additional information. Besides, mussel size has a differential effect on metal accumulation in soft tissues being small mussels the ones with a higher metal burden. Shell elemental composition analysis and digestive gland mapping by XRF revealed several patterns of elemental distribution which could help to understand possible changes on environment. Overall, the high metal concentration measured in mussels from Butroe in May and some pathological alterations detected in mussels from Barbadun estuary indicated that occasionally these estuaries suffer from some type of stress sources.

Key words: Mytilus galloprovincialis, Basque estuaries, trace metals, histopathology, biomarkers, chemical analyses

1. Sarrera eta motibazioa

Kostaldeko ekosistemek eremu sentikorrak dira, eta bertan gizakiek egindako presioak, askotan, ondorio ekologiko negatiboak eragin ditzake (Mejdoub et al., 2018). Giza jarduerak, hala nola mineralen edo erregaien fabrikazioa, zein hondakin-uren isurketa, aspaldidanik ezagutzen dira kutsadura-eragile moduan kostaldeko inguruneetan. Kutsatzaile-maila altuak egoteak kostaldeko ekosistemak kaltetu ditzake, eremu horietan bizi diren organismoak kaltetuz, baina ez hori bakarrik, giza osasunarentzako ere kaltegarriak izan daitezke (Solaun et al., 2013). Estuarioak, hain zuzen, populazio-gune handietatik hurbil egoten direnez, kutsatzaileenganako arrisku handiagoa dute (Guendouzi et al., 2020).

Honen adibidea Bizkaiko kostaldean kokatutako Barbadun eta Butroe estuarioak dauzkagu. Barbadun ibaia Kolitza mendian hasten da eta Kantauri itsasoan isurtzen da 4,53 kilometroko estuario bat osatuz Pobeña udalerriaren ondoan. Bestalde, Butroe ibaia Bizkargi mendian hasten da eta Plentzian isuritzen da 8,53 kilometroko estuario handiago bat eratuz. Bi estuario hauek presio ezberdinak jasaten dituzte haien uren kalitatea murriztu edo kaltetu ditzaketenak. Alde batetik, Barbadun estuarioak bai inguruko industria petrokimikoen eraginez, Cr, Ni, Cu eta Zn motatako metal astunak izan daitezkeenak, zein hiriko hondakin uren eraginak pairatzen ditu. Bestalde, Butroe estuarioak araztegiko uren isuriak jasan izan ditu zenbait urteetan zehar eta nagusiki uda aldera hiriko hondakin uren eraginak pairatu ditzake. Azken urteotan egindako ur kalitate jarraipen programen arabera, Barbadun estuarioko ur kalitatearen egoera ekologikoa “moderatu” bezala kontsideratu da eta Butroekoa, aldiz, “ona” bezala kontsideratu da (URA, 2020).

Estuarioen uren kalitatea monitorizatzeko zenbait estrategia existitzen dira, baina hedatuen dagoena bertako biotan ageri den kutsatzaileen bioakumulazioaren analisia da. Izan ere, kutsatzaileak estuarioen osasun-egoeran izan ditzaketen ondorioak egiaztatzeko, molusku bibalbio sesilak erabiltzen dira, hauek organismo zentinela eraginkorrak baitira kostaldeko uren egoera, bai eta bertako joerak aztertzeko. Organismo erabiliena muskuilua da, bere ezaugarri iragazleekin batera, gazitasun, tenperatura eta oxigeno maila ezberdinak jasan ditzakelako, urte osoan zehar eskuragarri dagoen espeziea izanik. Muskuilu espezie ezberdinen artean, erabiliena *Mytilus* generokoa izan ohi da, zeinak kostaldeko eta estuarioetako habitatetan aurkitzen baita.

Gainera, ikerketa askoren arabera, ikusi da muskuiluak metalak metatzeko gai direla ingurunean eskuragarri dauden metalen proportzio berean. Hori dela eta, muskuiluak *Mussel Watch* programan erabili ohi dira (Kimbrough et al., 2008), non kutsatzaileen presentziaren aldaketa espazio-tenporala aztertzen den hainbat estatutan.

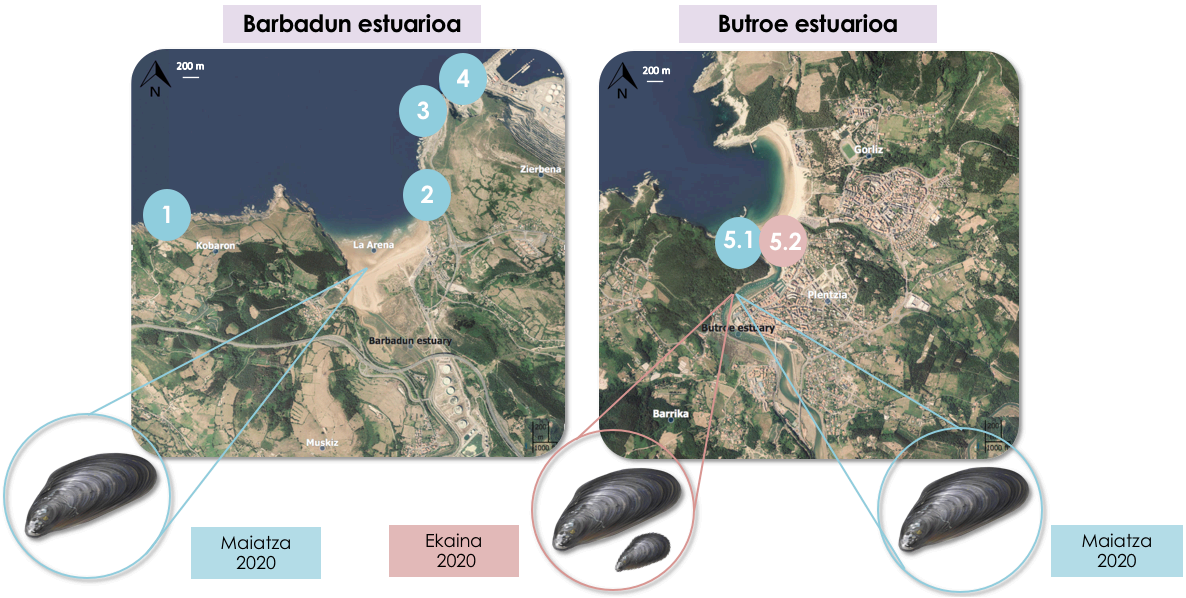
2. Ikerketaren helburuak

Ikerketa honek Barbadun eta Butroe estuarioen uren kalitatea ikuskatzea du helburu, bertako muskuiluetan ageri diren metalen bioakumulazioa eta ehun-mailako biomarkatzaileak aztertuz.

Kutsatzaileen presentzia eta horien banaketa muskuilu ehunetan aztertzeko eta haien ekosistemen osasun-egoerarekin erlazionatzeko, erabili diren biomarkatzaileak honako hauek izan dira: alde batetik, teknika histologikoak: esate baterako, digestio-guruinean dauden zilarrezko hauspeakin beltzen dentsitate bolumetrikoaren neurketa (ingelesetik *volumetric density of black silver deposits,* V_{vBSD}) autometalografia teknikaren bidez, indize histopatologikoen azterketarekin batera (digestio-tubuluen atrofia maila eta indize gonadalak). Eta bestetik, analisi kimikoak, besteak beste, masa espektrometriako detektagailua duen induktiboki akoplaturiko plasma (ICP-MS) muskuilu ehunetan metatutako metalen kontzentrazioa kuantifikatzeko eta X-izpiko Fluoreszentzia (XRF) teknika erdi kuantitatibo moduan metalen presentzia eta banaketa muskuiluen maskorretan eta ehunetan aztertzeko.

3. Ikerketaren muina

45 muskuilu espezimen (*Mytilus galloprovincialis*) bildu ziren laginketa-puntu ezberdinetan (1. irudia) 2020ko maiatza eta ekaina bitartean. Barbadun estuarioko laginketa-puntuak honela izendatu ziren: 1 Kobaron (43°21'08.5"N 3°08'32.9"W), 2 La Arena (43°21'15.2"N 3°06'48.3"W), 3 (43°21'45.6"N 3°06'37.1"W), eta 4 (43°21'37.2"N 3°06'43.0"W) azken bi hauek Punta Luceron kokatuta. Halaber, Butroe estuarioaren kasuan bi laginketa ezberdin burutu ziren laginketa-puntu berean, Plentzian (43°24'38.4"N 2°56'58.1"W), bat maiatzean, 5.1 izendatuta, eta bestea ekainean, 5.2. delakoa. Ekaineko laginketan bi tamainako muskuiluak hartu ziren, muskuiluen tamainaren eragina aztertzeko neurtutako parametroetan. Tamainaren sailkapena honela egin zen: 3 zentimetro arte “txikiak” kontsideratu ziren eta 3,5 zentimetro baino handiagoa zirenak “handi” moduan izendatu ziren.



1. irudia. Bizkaiko badiaren barruko azterketa-eremuaren mapa Barbadun eta Butroe estuarioen laginketa-guneekin. 1 (Kobaron), 2 (La Arena), 3 (Punta Lucero) eta 4 (Punta Lucero), eta 5.1, 5.2 (Plentzia hilabete ezberdinetan, 5.1 maiatzari dagokio eta 5.2 ekainari non muskuilu handiak eta txikiak eskuratu ziren). Eskala-barra 200 m.

3.1. Analisi histologikoa

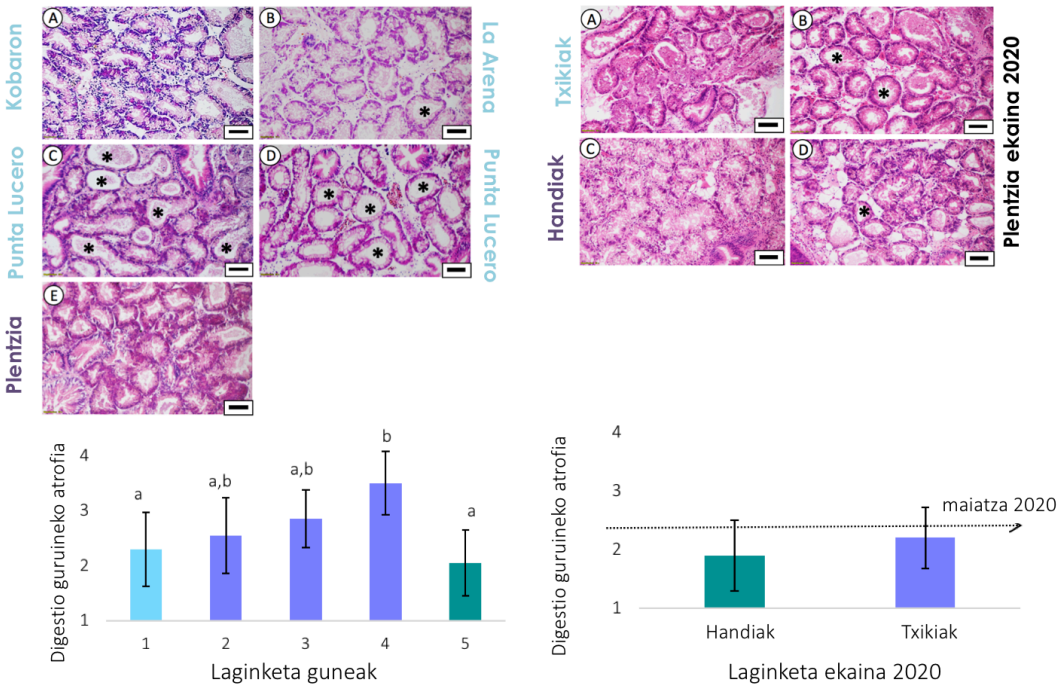
Gonadaren eta digestio-guruinaren deskribapen histologikoa egiterakoan, bi eratara konparatu ziren: alde batetik, Barbaduneko laginketa-guneen eta Butroe laginketa-guneen arteko alderaketa eginez, eta, bestetik, Butroe estuarioko laginen arteko ezberdintasunak aztertuz hilabete bat geroago hartutako tamaina ezberdineko muskuiluekin.

Oro har, analizatutako gonada guztiek antzeko heldutasun patroiak erakutsi zituzten, laginketa-garaiarekin bat zetozenak. Orokorrean gonadaren fase nahiko aurreratua (gametogenesi aurreratua-heldua) erakutsi zuten urte garaiarekin (maiatza-ekaina) bat datorrena. Honela, muskuiluak eskaera energetiko handiko egoeran zeuden, gametogenesiaren ondorioz (Ojeda et al., 2019). Bestetik, ez zegoen alde nabarmenik laginketa-puntu ezberdineko muskuilu ar eta emeen gonaden estadioen artean.

Zenbait autoreek egiaztatu dute moluskuen digestio-guruinak kutsatzaileen metaketan, desintoxikazioan eta hauen ezabapen prozesuetan parte hartzen duela. Ondorioz, digestio-guruinaren morfologia eta haren epitelioko zelula moten azterketa oso lagungarriak dira estres faktoreen inpaktuak ulertzeko (Arrighetti et al., 2019). Kutsatzaileen presentzia nabarmenak itsas inguruneetan muskuiluen zeluletan aldaketa larriak eragin ditzake, esaterako digestio-guruineko zelula digestibo eta basofilikoen proportzioan, baita digestio-guruineko hodien atrofia mailan ere.

Aipatu ditugun bi alterazioen artean, digestio-guruinen atrofiari dagokionez, digestio tubuleko paretak argaltzea du ezaugarri (Garmendia et al., 2011). Baldintza honen eragileak estres mota askori egotzi zaizkie, hala nola, kutsatzaileei eta elikadura-horniduran gertatzen diren aldaketei.

Parametro honen emaitzei dagokienez (2. irudia), muskuiluen digestio-guruinen egitura Butroe estuarioan, ustez inpaktu gutxiko eremua, epitelio geruza bakarrez osatua zegoen non digestio-zelula zein zelula-basofilikoak ageri ziren lumen estu batekin batera (Arrighetti et al., 2019). Halaber, Punta Luceron 3. eta 4. laginketa-puntuetan bildutako muskuiluen digestio-guruinetan digestio-hodien atrofia maila altua zen, lumenaren handitze eta zelula epitelialen lodiera murriztuz, ehun interstizial desegituratuekin batera.



2. irudia. Digestio-guruinaren atrofia maila, ezkerrean 1-5.1 (A-E) laginketa-puntuetan lortu diren emaitzak eta eskuinean 5.2 (A-D) (Pentzia ekaina 2020) lortutakoak. (*) Bereziki atrofia-maila altua duten digestio-tubuluak. Eskala-barra = 50 µm. Behean, neurtutako atrofia mailen grafikoa ageri da, estatistikoki desberdinak diren taldeak letra desberdinez adierazita.

Parametro honetan ezberdintasun esangarriak 4. estazioko muskuiluen (Punta Lucero) eta 1. (Kobaron) eta 5. (Plentzia) puntuko muskuiluen artean aurkitu ziren, iradoki zutenak 4. puntuko muskuiluek estres handiagoa pairatzen zutela. 1. (Kobaron) estazioaren kasuan, digestio-guruinean lortutako indize histopatologikoen balio baxua, muskuiluak estuariotik pixka bat aldenduta eta nolabait itsaso zabalean egotearen ondorioz izan daiteke (Belzunce et al., 2004; Cuevas et al., 2015).

Muskuiluen tamaina, euren adin eta heldutasunarekin erlazionatzen da, eta eragina du animalien ingurumen-estresekiko erantzunean (Richir & Gobert, 2014). Tamaina handiko muskuiluek ingurumen-aldaketekiko sentiberagoak zirela ikusi da, tamaina txikikoekin alderatuz. Horrela, *M. galloprovincialisen* kasuan ikusi zen atrofia mailak eragin handiagoa zuela muskuilu handietan txikietan baino. Hala ere, lagin gehiago analizatu beharko lirateke ondorio sendoagoak lortzeko zentzu honetan.

3.2. Metal ioien kuantifikazio autometalografikoa muskuiluen digestio-guruinen ebakietan

Lortutako V_{vBSD} balioak 2,5 $\mu m^3/m^3$-tik beheragokoak edo hurbilekoak izan ziren kasu guztietan, eta horrek metalen presentzia moderatua duen laginketa-puntuak ditugula adierazi zuen, eta beraz aztertutako muskuiluen digestio-guruinean metal-maila ertaina dela ondoriozta daiteke (Soto & Marigómez, 1997). Aurreko urteetan egindako ikerketetan lortutako balioak laginketa-puntu horietan bertan konparatuz, ondoriozta daiteke joera murrizten jarraitzen dutela. Guztira, emaitzek parametro honen hobekuntza erakusten dute urteetan zehar, azterketa-eremuko muskuiluetan hauteman den metalen bio-eskuragarritasunaren arabera.

3.3. Metalen kuantifikazioa muskuiluen ehun bigunetan masa espektrometriako detektagailua duen induktiboki akoplaturiko plasmaren (ICP-MS) bidez

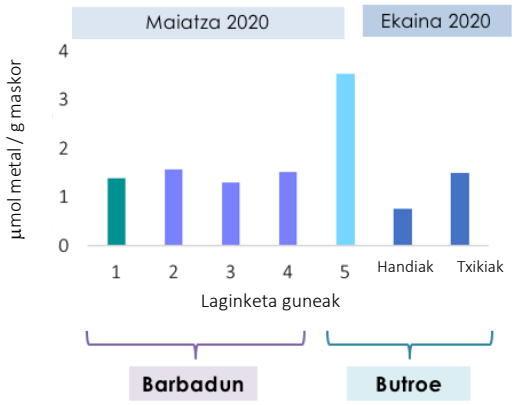
Lan honetan, metalen kontzentrazioak bi modutan eman ziren: kontzentrazio gordin bezala (µg metal/g ehun pisu lehorra) eta metal/maskor, MSI, indizearen arabera (ingelesetik *metal shell index*) normalizatua (µg metal/g maskor pisu lehorra). Modu honetan, bi parametro erabili daitezke metalen kontzentrazioetan aldaketak aztertzen direnean.

Metalak neurtzeko bi moduek oso antzeko joera erakutsi zuten, eta horren arrazoia egoera gametogeniko zein indize gonadalen balio antzekoen ondorio izan zitekeen, izan ere, muskuilu guztiak antzeko garapen-fasean egoteak ehun/maskor pisu erlazioa antzekoa izango dela iradokitzen du. Zentzu honetan, ikerketa honetan MSIrentzat lortutako balioek ez zuten informazio gehiagorik ematen metalen bioeskuragarritasunari buruz, eta, beraz, ehun bigunetan lortutako balioak metal-kontzentrazioei dagokienez beste autore batzuek lortutako balioekin alderatu ziren.

µg metal/g pisu lehor kontzentrazioak handitik txikira 1-5.1 tokietan, honako hauek izan ziren: Fe > Al > Zn > V > Se > Cu > Ni > Pb > Cr > Co > Cd; aldiz, tamaina ezberdineko muskuiluen metal-kontzentrazioak Zn > Fe > Al > Cu > Se > Cr > Ni > Pb > V > Co > Cd izan ziren. Horrela, ehun bigunetan metal-karga osoaren ekarpenik handiena Fe, Al eta Zn-i egotzi zitzaien, kasu bietan.

1-5 estazioen emaitzek adierazi zutenez, hiru metal-talde zeuden, estatistikoki antzekoak ziren balioak zituztenak: lehena V, Cd, Co, Cr, Pb, Ni, Cu eta Se, bigarrena Zn eta Al, eta, azkenik, Fe zegoen, gainerako metalen aldean oso ezberdina zena haren balio altuagatik. Aipagarria da Butroeko estuarioan maiatzeko muskuiluetan neurtutako metal kontzentrazio altua eta baita ere hilabete bat beranduago behatutako metalen kontzentrazioen jaitsiera, metalen mailak Barbaduneko muskuiluen mailetara (edo beheragoetara) jaitsiz.

Azkenik, ehun bigunetan metalen kargaren emaitzek (3. irudia) baieztatu zuten metalen kontzentrazio handiagoa muskuilu txikietan handietan baino, beste ikerketa batzuen arabera lortu ziren emaitzekin bat datozenak, non muskuilu-ehunen pisu lehorra handitu zenean ehunetako metal-kontzentrazioa gutxitu egin zela deskribatu zuten (Sparks et al., 2014).



3. irudia. Laginketa-puntuetan neurtutako metal bioeskuragarritasun totala (Al, Fe, Zn, V, Cr, Co, Ni, Cu, Se, Cd eta Pb) 1 (Kobaron), 2 (La Arena), 3 and 4 (Punta Lucero), 5.1 (Plentzia maiatza 2020) eta 5.2 (Plentzia ekaina 2020, muskuilu txikiak eta handiak).

3.4. Muskuiluen maskorren eta digestio-guruinen analisi elementala X-izpien Fluoreszentziaren bidez

Muskuiluak garatzen ari diren bitartean, bestelako elementuak gehitu ditzakete maskorren karbonato matrizean. Horrela, maskorraren kimikak inguruko ur-masaren oinarrizko kimika islatu ahal izango du geokimikoki pasiboa eta biologikoki aktiboa den garraioaren bidez maskorretan metatuz (Honig et al., 2020), elementu hauek, garapen garaian, banakoak bizi izan zituen ingurumen-baldintzekin erlazionatuta egongo baitira (Becker et al., 2005). Hala ere, maskorretan metalen inkorporazio hau prozesu geldoa da ehunetako metalen metaketarekin alderatuz, eta interpretazio konplexuago baten beharra izango luke.

Korrelazio analisien bidez frogatu zen lehen mailako elementuak, edo oinarrizko elementuak (Na, Mg, Sr, Ca) era positiboan korrelazionatzen zirela haien artean bi estuarioko maskor laginetan, eta gauza bera gertatzen zela kutsatzaile susmagarrientzat (Al, Cu, Zn, Mn), kasu batzuetan, ustezko kutsatzaileen eta maskorraren oinarrizko elementuen arteko korrelazio negatiboa izanik.

Aldagai anitzezko analisiari dagokionez, *Partial Least Square Discriminant Analysis* (PLS-DA) aldagai anitzeko analisia burutzeko erreminta erabili zen (MatLab). Maskorren analisirako emaitzek frogatzen zuten oinarrizko osagaiek antzeko eredu bat jarraitu zutela muskuiluen maskor osoan zehar (zati berrienetik zati zaharrenera), banaketa argiagoa eginez orain dela gutxi formaturiko zatian, erosioak eta ingurumen-baldintzek oinarrizko osagaien mihiztaketan eragina izan dezaketela iradokiz. Gainera, kutsatzaile susmagarriek antzeko joera ere erakutsi zuten oskolaren alde bietan, Co bezalako elementu batzuetan aldaketa txikiak eginez.

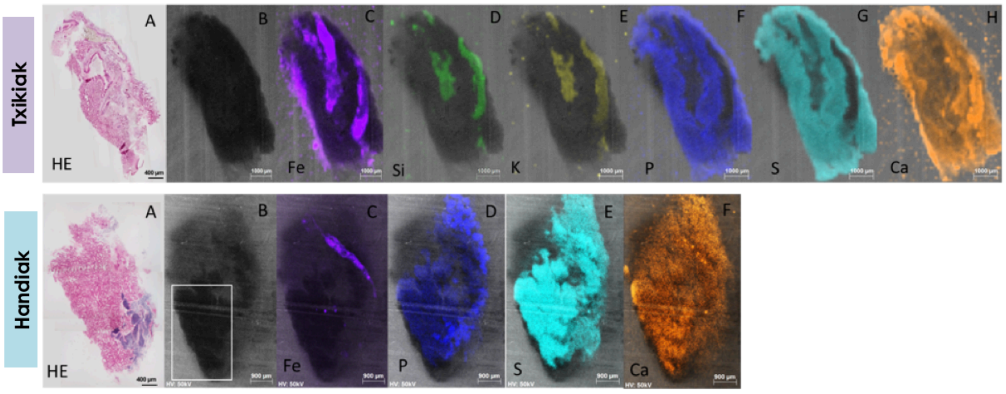
Ikusi zen Butroe estuarioan laginketa denborak eragina izan zuela elementuen portaeran, bereziki maskorretako oinarrizko elementuentzat hauek ezberdinak izanda. Hala ere, kutsatzaile susmagarriek ez zuten halako ezberdintasunik erakusten zentzu horretan. Bestalde, Barbadun estuarioari dagokionez, banaketa homogeneoagoa behatu zen. Oinarrizko konposatuentzat, Barbaduneko kasuan, eredu sendoagoa iradokitzen da, laginketa-puntuen arteko aldakortasun txikiagoekin eta beharbada aztertutako

puntuetan uretan dagoen aldakortasun baxuagoari egotzi ahal zaizkiona. Hala ere, batez ere maskorren alde zaharrenean, kutsatzaile susmagarrien banaketa aldakorragoa izan zen eratu berrian baino, metal ez-esentzialak denboran zehar kentzeko ahalegin bat egin dela somatuz bi kasuetan.

Gainera, maskorraren bi aldeetan, aldagai anitzeko analisietatik ikusi zen Fe-k portaera ezberdina erakutsi zuela beste elementu batzuen aldean, batez ere Plentziako muskuiluetan, hauek ehun-bigunen analisian lortutako emaitzekin bat zetozenak, alegia, teknika bien konbinazioa lagungarria izan daitekeela metalen ondorioak eta patua hobeto ulertzeko muskuiluetan.

3.5. Butroe estuarioko tamaina ezberdineko muskuiluen digestio-guruinaren analisi elementala X-izpien Fluoreszentziaren bidez

Ikerketa honetan, Fe, Si, K, S, eta Ca bezalako elementuak tamaina ezberdineko muskuiluen digestio-guruinen ehunetan detektatu ziren (4. irudia). Informazio koherenterik lortu ez zen arren, frogatuta geratu zen gauzatutako beste esperimentu batzuekin zenbait harreman lortu zirela, esaterako, Fe metaketa handiagoa egotea muskuilu txikietan handietan baino, ICP-MS-tan lortutako emaitzekin bat datozenak.



4. irudia. Butroe estuarioko tamaina ezberdineko muskuiluen digestio-guruin baten ebakiaren mapaketa X izpien fluoreszentzia analisiaren bidez lortua, bertan zenbait elementuen (Fe, Si, K, P, S eta Ca) distribuzioa ehunean ageri da. Zuriz markatutako area muskuilu handietan (B) bertako A irudiko hematoxilina-eosinaz tindatutako zonaldea da. Eskala-barra 900 µm

Hala ere, azterketa sakonago bat egin behar da etorkizuneko proiektuetan, kontuan izanda aurkikuntza interesgarriak lor daitezkeela diseinu esperimental egoki batekin. Hala eta guztiz, lortutako emaitza nabariak, hala nola, P eta S-ren presentzia proteina-aberatsak izan daitezkeen zonaldetan (sufre eta fosfato eduki altua) banaketa-bide bera ikuskatzea lehen urrats ona izan litezke.

4. Ondorioak

Muskuilu-ehunen analisi histologikoek garapen gametogenikoaren eta digestio-guruinaren atrofia mailari buruzko informazioa eman zuten. Lortutako informazioari esker ondoriozta dezakegu Barbadun eta Butroe estuarioetako muskuiluek antzeko ugalketa-ereduak erakutsi zituztela. Digestio-guruinen atrofia mailaren arabera, balio altuenetik baxuenera 4 (Punta Lucero) > 3 (Punta Lucero) > 2 (La Arena) > 1 (Kobaron) > 5.1 (Plentzia) laginketa-guneak izan ziren. Tamaina ezberdineko muskuiluen kasuan ez zegoen alderik parametro horretarako. Bestalde, V_{vBSD} baliorik baxuena Punta Luceroko bigarren laginketa-puntuan neurtu zen, 4, zeinak atrofia maila goreneko puntua ere izan zen, honek adierazi dezake digestio-zelulen gabeziak metalaren bahiketaren gaitasunean eragin dezakeela, metalak ez diren bestelako kutsatzaileek eraginda, esaterako PAHak. V_{vBSD}ren arabera, neurketa hau muskuiluen tamainak eragina zuen, muskuilu handietan V_{vBSD} balio altuagoak lortuz.

Analisi kimikoek aldeak erakutsi zituzten muskuiluen metalen metaketan, balio altuenak lortuz 5.1 laginketa-puntuan (Plentzia maiatza), eta jarraituz 2 (La Arena) > 4 (Punta Lucero) > 1 (Kobaron) > 3 (Punta Lucero) laginketa-puntuekin. Plentziarako lortutako balioa deigarria da, izan ere Butroe estuarioa toki garbi bezala kontsideratu da, eta agian Butroe estuarioan gertatutako ezusteko gertaera baten ondorioa izan daiteke. Tamaina ezberdineko muskuiluei dagokienez, erantzun ezberdinak lortu ziren metalen ehun-kontzentrazioetan, muskuilu txikiak metalak metatzeko joera handiagoa erakutsiz.

Azkenik, Mikro-XRF analisien bidez egindako neurketek tresna analitiko potentzial bat erakutsi zuten, maskorren oinarrizko konposizioa eta muskuiluen bizitzan zehar kutsadurak eragindako aldaketa

posibleak aztertzeko adierazle gisa aplikatzeko. Hala ere, bere egiazkotasuna ez dago guztiz frogatuta literaturan dauden datuen gabezia dela eta, eta horrek datuen interpretazioa zailtzen du.

5. Etorkizunerako planteatzen den norabidea

Orokorrean, lan honetan lortutako emaitzen arabera, komenigarria litzateke bi estuario hauen monitorizazioa egiten jarraitzea. Butroe estuarioan maiatzean ikusitako metal kontzentrazio altuek, eta Barbaduneko laginketa-puntu batzuetan (3. eta 4. puntuak, Punta Luceron) neurtutako digestio tubuluen atrofia maila altuek iradokitzen dute nolabait estuario hauek, puntualki bada ere, estres iturrien presentzia jasaten dutela zeinak denborarekin ekosistema hauetan arazo larriak ekarri ditzakenak.

Bestalde, egun mota honetako lanetan XRF bezalako tekniken aplikazioa oso mugatua den arren, eta literaturaren gabeziak ezartzen dituen mugak datuen interpretazioa zailtzen duen arren, gure ustez pena merezi du honelako tekniken inplementazioan esfortzu bat egitea, izan ere, potentzial interesgarria baitute.

6. Erreferentziak

Arrighetti, F., Landro, S. M., Lambre, M. E., Penchaszadeh, P. E., & Teso, V. (2019). Multiple-biomarker approach in the assessment of the health status of a novel sentinel mussel *Brachidontes* in a harbor area. *Marine Pollution Bulletin*, 140, 451-461.

Becker, B. J., Fodrie, F. J., McMillan, P. A., & Levin, L. A. (2005). Spatial and temporal variation in trace elemental fingerprints of *Mytilid* mussel shells: A precursor to invertebrate larval tracking. *Limnology and Oceanography*, 50(1), 48-61.

Belzunce, M. J., Solaun, O., Valencia, V., & Pérez, V. (2004). Contaminants in estuarine and coastal waters. *Elsevier Oceanography Series*, 70, 233-251.

Cuevas, N., Zorita, I., Costa, P. M., Franco, J., & Larreta, J. (2015). Development of histopathological indices in the digestive gland and gonad of mussels: Integration with contamination levels and effects of confounding factors. *Aquatic Toxicology*, 162, 152-164.

Garmendia, L., Soto, M., Vicario, U., Kim, Y., Cajaraville, M. P., & Marigómez, I. (2011). Application of a battery of biomarkers in mussel digestive gland to assess long-term effects of the Prestige oil spill in Galicia and Bay of Biscay: Tissue-level biomarkers and histopathology. *Journal of Environmental Monitoring*, 13(4), 9-15.

Guendouzi, Y., Soualili, D. L., Fowler, S. W., & Boulahdid, M. (2020). Environmental and human health risk assessment of trace metals in the mussel ecosystem from the Southwestern Mediterranean. *Marine Pollution Bulletin*, 151, 110-820.

Honig, A., Etter, R., Pepperman, K., Morello, S., & Hannigan, R. (2020). Site and age discrimination using trace element fingerprints in the blue mussel, *Mytilus edulis*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 522, 151-249.

Kimbrough, K. L., W. E. Johnson, G. G. Lauenstein, J. D. Christensen and D. A. Apeti. 2008. An Assessment of Two Decades of Contaminant Monitoring in the Nation's Coastal Zone. Silver Spring, MD. NOAA Technical Memorandum NOS NCCOS 74. 105-106.

Mejdoub, Z., Zaid, Y., Hmimid, F., & Kabine, M. (2018). Assessment of metals bioaccumulation and bioavailability in mussels *Mytilus galloprovincialis* exposed to outfalls pollution in coastal areas of Casablanca. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 48, 30-37.

Ojeda, M., Boy, C. C., & Giménez, J. (2019). Reproductive aspects and energy allocation compromise to aerial exposure in the intertidal mussel *Brachidontes*. A case study at two tidal levels. *Journal of Sea Research*, 155, 101-824.

Richir, J., & Gobert, S. (2014). The effect of size, weight, body compartment, sex and reproductive status on the bioaccumulation of 19 trace elements in rope-grown *Mytilus galloprovincialis*. *Ecological Indicators*, 36, 33-47.

Soto, M, & Marigómez, I. (1997). Metal bioavailability assessment in mussel-watch programmes by automated image analysis of autometallographical black silver deposits (BSD) in digestive cell lysosomes. *Marine Ecology Progress Series*, 156, 141-150.

Solaun, O., Rodríguez, J. G., Borja, A., González, M., & Saiz-Salinas, J. I. (2013). Biomonitoring of metals under the water framework directive: Detecting temporal trends and abrupt changes, in relation to the removal of pollution sources. *Marine Pollution Bulletin*, 67(1-2), 26-35.

Sparks, C., Odendaal, J., & Snyman, R. (2014). An analysis of historical Mussel Watch Programme data from the west coast of the Cape Peninsula, Cape Town. *Marine Pollution Bulletin*, 87(1-2), 374-380.

URA, 2020. Red de seguimiento del estado ecológico de las aguas de transición y costeras de la Comunidad Autónoma del País Vasco. Informe de resultados. Campaña 2019. 410-411.

Fe_3O_4-zko Nanopartikulak: Kantzerraren Aurkako Hipertermia Magnetikoa

Ander Barón[1], Daniela Iglesias[1], Irati Rodrigo[2], Idoia Castellanos[2], Maite Insausti[1]

[1]Kimika ez-organiko saila, Zientzia eta Teknologia Fakultatea, UPV/EHU, Sarriena auzoa, s/n, 48940, Leioa, Espainia, [2]Elektrizitate eta Elektronika saila, Zientzia eta Teknologia Fakultatea, UPV/EHU, Sarriena auzoa, s/n, 48940, Leioa, Espainia.
ander.baron@ehu.eus

Laburpena

Lan honetan, magnetitazko nanopartikula magnetikoak eskuratzeko metodoa optimizatu da, eta eskuratutako nanopartikulak hipertermia magnetiko bidezko kantzerraren terapia aurrera eramateko ikertu dira. Horretarako, hauen funtzionalizazioa burutu da, aldez aurretik sintetizaturiko polimero bat erabiliz, eta bere beroketa ahalmena aztertu da, eremu alternoko magnetometria baliatuz.

Hitz gakoak: kantzerra, terapia, hipertermia, magnetiko, nanopartikula, magnetita.

Abstract

In this work, we have carried out the optimization of a method for obtaining magnetic nanoparticles of magnetite, which have been studied as inductors of magnetic hyperthermia against cancer. For this, a functionalization has been carried out, using a previously synthesized polymer and the heating capacity has been studied by means of alternating field magnetometry.

Keywords: cancer, therapy, hyperthermia, magnetic, nanoparticle, magnetite.

1. Sarrera eta Motibazioa

Egun, zientzia eta teknologiaren inguruan bogan dagoen alderdietako bat nanoteknologia da, zeina tamaina nanometrikoko osagaiak dituzten material eta gailuen ikerkuntzan eta manufakturan datzan, eskala hauetan agertzen diren propietate eta fenomenoak ustiatzeko asmoz (Sanjay eta Pandey, 2017). Honi esker, nanomedikuntza agertu da. Medikuntzaren arlo honetan, gizakion osasuna bermatzeko erreminta bezala nanoteknologia erabiltzea proposatzen da, bai diagnosian, baita terapian ere. Honela, gaixotasunen detekzio azkarragoa, aldez aurreko eta pertsonalizatutako tratamendu eta jarraipena egiteko metodoak garatzen ari dira (Gatteschi et al., 2012). Medikuntzan erabiltzen diren material nanometriko garrantzitsuenen artean, nanopartikula magnetikoak (MNP) aurkitzen dira (Dixit et al., 2012). Bere tamainaren ondorioz, propietate kimiko zein fisiko bereziak erakusten dituzte eta erabilgarritasun zabala dutela frogatu da (Maity et al., 2012). Nanomedikuntzaren arloan, eta terapia onkologikoetan hain zuzen, hipertermia magnetikoa garatu da. Minbiziaren testuinguruan *hipertermia magnetiko* terminoak zelula tumoralak beroaren bidez akabatzeari egiten dio erreferentzia. Beroaren ondorioz, 41-46ºC tartean, zelulen proteinen desnaturalizazioa eta ADN-aren aglutinazioa ematen dira, apoptosia gertarazten duena (Keywan et al., 2021). Beraz, minbizia sendatzeko izugarrizko abantaila suposatuko luke metodo honek, beste batzuekiko. Hipertermia magnetikoa lortzeko, MNPak erabiltzen dira, eremu magnetiko alterno (AC) bat baliatuz. Izan ere, frekuentzia nahikoa duen kanpo AC eremu baten barruan murgiltzen den edozein material magnetikok beroa sortzeko ahalmena du. MNPen kasuan, prozesu hau baimentzen duten mekanismo fisikoak partikularen momentu magnetikoaren barne errotazioa (*Neel erlaxazioa*) eta partikula beraren errotazioa eremuaren ardatzarekiko (*erlaxazio Browniarra*) dira. Bi mekanismoen beroa sortzeko ahalmena neurtzeko modurik erabiliena absortzio-indize espezifikoa (SAR) da. SARa neurketa kalorifiko zein magnetikoen bidez lortu daiteke. Neurketa magnetikoen kasuan, laginaren *imanazioa vs AC eremuarekiko* irudikatuz, histeresi-ziklo bat lortuko da, zeinaren azalera nanopartikula magnetikoen SAR-arekin zuzenki proportzionala den eta hurrengo formula (1) erabiliz kalkulatu daiteke (Lahiri et al., 2017).

$$SAR = \frac{-f}{c}\mu_o \oint M\,(t)dH \quad (1)$$

non f eremu-magnetiko alternoaren maiztasuna (Hz), c NP koloidearen kontzentrazioa (masa/bolumena) eta μ_o hutsaren iragazkortasun magnetikoa ($4\pi \cdot 10^{-7}$ T mA^{-1}) diren (Harabech et al., 2017).

2. Arloko Egoera

Egun, hipertermia magnetikoa beste ohiko terapiekin batera erabiltzen da, berez ez baita gai tumoreak akabatzeko, erabiltzen diren materialak ez baitute bero nahikorik sortzen (Maldonado-Camargo et al., 2016). Hipertermiaren eginkizuna bete dezaketen materialetako bat burdina oxidozko nanopartikulak (IONP) dira, hauen artean magnetitazko nanopartikulak gailentzen direlarik (Paliwadana-Arachchige et al., 2017). Magnetita (Fe_3O_4) naturan agertzen den mineral magnetikoa da. Burdina bi oxidazio egoera desberdinetan aurkezten ditu eta bere egitura alderantzizko espinela da. Bere formula $Y\{XY\}O_4$ moduan adierazten da, non $X=Fe^{2+}$ eta $Y=Fe^{3+}$ dira eta kortxeteek hutsune oktaedrikoak adierazten dituzten. Egitura-kristalinoan geruza oktaedriko eta tetraedriko/oktaedrikoak txandakatzen dira, materialaren izaera ferrimagnetikoaren erantzule izanik (Cornell and Schwertmann, 2003).

Magnetismoa ez ezik, IONPak oso aproposak dira medikuntzan erabiltzeko, bere biobateragarritasun altua dela medio; behin gorputzean, NPen burdin ioiak organismora erraz gehitu daitezke, endozitosi prozesuen bidez, eta beraz, ez dira bat ere toxikoak. Abantaila handia dirudien arren, IONPak giza gorputzean egon daitezkeen denbora asko murrizten du honek, hipertermia burutzeko zailtasun nagusia izanik. Irtenbide bezala, NPen gainazalari biobateragarriak diren molekulak lotzen dira (funtzionalizazioa) (Rai and Kon, 2015; Stark, 2011). Molekula hauek polietilenglikola (PEG) bezalako polimero hidrofiliko eta ez-ionikoak izan ohi dira. Horrela, IONPak gorputzean dirauten denbora, egonkortasun-koloidala eta EPR (*enhanced permeability and retention*) efektu bidezko pilaketa ehun tumoralean hobetzen dituzte (Sangnier et al., 2019). Hala ere, oraindik ez dago argi MNPen eraginkortasunaren murrizketa fagozitosiaren ondorio den bakarrik. Zenbait ikerketaren arabera, ingurune fisiologikoan NPek beren arteko elkarrekintza magnetikoengatik eta ingurunearekin ematen diren elkarrekintza ionikoengatik jasaten duten agregazioaren ondorioz murrizten dute bere erabilgarritasuna (Mejias et al., 2019). Honi begira, zenbait autorek MNPak euskarri mikroskopikoetan (mikroesferak, mikrodiskak, etab.) ezarriz, arazo hauek saihesteko ahaleginak egiten ari dira. Hala ere, polimeroekin burututako NPen banakako funtzionalizazioa lortuz, nahikoa izan beharko litzateke edonolako elkarrekintza ekiditeko (Castellanos-Rubio et al., 2019). Bestalde, funtzionalizazioa burutzeko polimeroak eraldatuz, posible da NPei antigorputzak edota proteinak lotzea, hauek ehun edo sistema biologiko konkretuetara (zelula mota zehatz baten mintza, adibidez) bideratuz, antigorputz-antigeno elkarrekintza dela medio. Hau oso baliagarria izango litzateke kantzerraren aurkako terapietan, izan ere, tumore-zelulek bere gainazalean hainbat proteina mota gainadierazteko joera dute (Sánchez, 2013). Azkenik, polimeroen eraldaketari dagokionez, posible da hauei fluoreszentzia aurkezten duten molekulak (fluoroforoak) lotzea. Honela, MNPek hipertermia magnetikoan duten errendimendua kalkulatu ahalko zen, fluoreszentziaren prozesu erradiatzaileek tenperaturarekiko menpekotasun handia baitute. Horrez gain, posible izango litzateke NP hauek zeregin konplexuagotan erabiltzea, hala nola, fluoreszentzia bidezko irudi medikoak sortzeko edo tenperatura lokalaren adierazle moduan. Horrela, MNPak gauza izango lirateke bai kantzerraren diagnostikoa, bai bere tratamendua gauzatzeko, agente teragnostiko bihurtuz. Gainera, NPen azalera-espeziko handia dela eta, fluoroforo kontzentrazio lokal handiak lortuko liratezke eta, MNPen momentu-magnetiko iraunkorraren ondorioz, fluoreszentzia kontrolatzeko prozesuak (*quenching*) burutu ahal izango ziren, seinale optikoaren kontrola bermatuz (Chen et al., 2019).

3. Ikerketaren Helburuak

Lan honetan hipertermia magnetikoan erabiltzeko magnetitazko MNPak sintetizatu dira. Horretarako, konposatu metal-organikoen deskonposizio termikoa erabili da. Sintesi mota honek NPen morfologiaren eta tamaina banaketaren gaineko kontrol handia ematen baitu. Prozesuaren muina nahiko sinplea da: irakite-tenperatura altuko disolbatzaileetan NPen aurrekaria termikoki deskonposatzen da, surfaktanteen presentzian, zeinek NPen hazkundea kontrolatu ahal duten. Zehazki, magnetitazko NPak eskuratzeko, burdina oleatoaren ($Fe(oleato)_3$) deskonposaketa burutu da. Bestetik, hipertermia magnetikoan erabili ahal izateko, NPen funtzionalizazioa burutu da anhidrido polimaleiko-alt-1-oktadezeno-polietilenglikol (PMAO-PEG) kopolimeroa erabiliz. Prozesu osoan zehar, erabilitako metodologia ahalik eta gehien optimizatu da, errepikakortasuna helburu nagusia izanik. Lortutako MNPak X-izpien difrakzioa (XRD) erabiliz identifikatu dira Fe_3O_4 moduan (*Fd-3m*, a=8,39Å) eta *Scherrer* ekuazioa erabiliz, tamaina kristalinoa kalkulatu

da. Transmisio elektronikozko espektroskopiaren (TEM) bidez, laginen tamaina banaketa eta itxura aztertu dira. Lagin dardakariko magnetometriarekin (VSM), NPen saturazio-imanazioa (Ms) lortu da. Termograbimetría (TG) erabiliz, NPen sintesitik eratorritako eta bere gainazalari lotutako materia organikoa kalkulatu da, nanopartikulen propietate magnetikoak materia ez-organikora doitzearren.

4. Ikerketaren muina

4.1. Fe_3O_4 NPen sintesia

Lehenik, $Fe(oleato)_3$ aurrekari metal-organikoa sintetizatu da. 40 mmol $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ eta 120 mmol sodio oleato ($C_{18}H_{33}O_2Na$), 140 mL hexano, 80 mL EtOH eta 60 mL ur destilatutan disolbatzen dira. Nahastea mekanikoki irabiatzen da, erreakzio-ingurunea N_2 atmosferan mantentzen den bitartean. Sistema birfluxura eramaten da, 5°C/min-ko berotuz, 60°C arte, non birfluxua ordu batez mantentzen den. Bukatzean, hozten utzi eta faseak banatzen dira. Fase organikoa ur destilatuarekin garbitzen da hiru aldiz (3x100 mL) eta disolbatzailea berotan lurruntzen da. Lortutako likido likatsua 110°C-tan 21 orduz mantentzen da, ur guztia lurruntzeko.

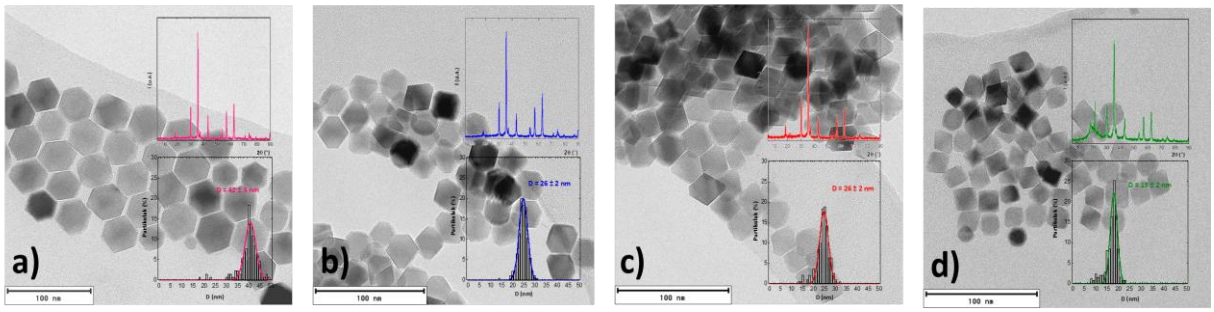
Nanopartikulen sintesia burutzeko, 5 mmol $Fe(oleato)_3$, oktadezeno, bentzil eter eta 10 mmol azido oleikotan disolbatzen da. Erreakzio nahastea N_2 atmosferan mantentzen da eta mekanikoki irabiatzen den bitartean, 10°C/min-ko berotzen da, 110°C lortu arte, non tenperatura 30 minutuz mantentzen den. Ondoren, 10°C/min-ko berotuz, tenperatura 190°C-ra eramaten da, non beroketa 3°C/min-ra jaitsi eta birfluxura eramaten da, 315-320 °C-an. Birfluxua ordu betez mantentzen da. Amaitzeko, nahastea hozten utzi eta 5 mL THF eta 10 mL EtOH-rekin biltzen da. Lortutako nahastea 50 minutuz zentrifugatzen da, 6°C-tan eta 22000 RPM erabiliz hiru aldiz (Hufschimd et al., 2015)). Azken garbiketaren ostean, nanopartikulak 15 mL CHCl3-tan sakabanatzen dira.

Guztira, lau saiakuntza eraman dira aurrera, eta bakoitzean birfluxu denbora eta disolbatzaile kantitateak aldatu dira, honen efektua aztertzearren. Lortutako emaitzak 1. taulan eta 1. irudian ikusi daitezke. Emaitzetan ikusten denez, gero eta erreakzio nahaste bolumena txikiagoa izan, birfluxu tenperatura altuagoa da eta NP tamaina handiagoa lortzen da. Sintesi baldintzak aldatuz frogatu egin da NP desberdinak lortzen direla. Antzeko baldintzetan egindako sintesiek (M2 eta M3), antzeko NPak sortzen dituzte, beraz metodoa errepikakorra da. TEM irudietan ikusten denez, lortutako NPak morfologia kuboktaedrikoa (M1) edo oktaedrikoa (M2, M3 eta M4) aurkezten dute. TEM irudietatik, NPen difraktogramekin batera, laginak monokristalak direla ondorioztatu daiteke. Bestetik, lortutako Ms balioak (1. Taula) magnetita makroskopikoarena, 92 emu/g (Smit and Wijn, 1959) baino baxuagoak dira , M2 laginean izan ezik. Hau baieztatzeko *Mössbauer* espektroskopia bezalako teknika aurreratuak erabili beharko lirateke.

1. Taula. Fe_3O_4 NP sintesien oktadezeno eta bentzil eter bolumena, birfluxu tenperatura, XRD eta Scherrer ekuazioa erabiliz kalkulatutako NP tamaina, TEM irudietatik lortutako tamaina, NPen gainazalari lotutako materia organikoa eta saturazio imanazioa (Ms).

Lagina	Oktadezeno (mL)	Bentzil eter (mL)	T birfluxu (ºC)	D_{XRD} (nm)	D_{TEM} (nm)	M.O. (%)	Ms (emu/$g_{Fe_3O_4}$)
M1	8	4	327	41 ± 2	41 ± 2	62	88 ± 2
M2	10	5	317	24 ± 2	25 ± 2	35	97 ± 1
M3	11	5.5	314	22 ± 2	24 ± 2	34	87 ± 2
M4	12	6	310	17 ± 1	18 ± 2	33	80 ± 4

1. Irudia. Fe_3O_4 laginen TEM irudia, tamaina banaketa (histograma) eta difraktograma. a) M1. b) M2. C) M3. d) M4.



4.2. MNPen funtzionalizazioa

Aipatu den moduan, MNPen erabilgarritasuna hipertermia magnetikoan frogatzeko, M2 eta M4 laginak funtzionalizatu dira PMAO-PEG kopolimeroa erabiliz. Hasteko, kopolimeroaren sintesia burutu da. $2.84 \cdot 10^{-2}$ mmol anhidrido polimaleiko-alt-1-oktadezeno (PMAO) 100 µL $CHCl_3$-tan disolbatzen dira. Bestalde, $2.13 \cdot 10^{-2}$ mmol PEG-NH_2 250 µL $CHCl_3$-tan disolbatzen dira. PMAO disoluzioa PEG disoluzioaren gainean gehitzen da pixkanaka. Nahastea 24 orduz irabiatzen da magnetikoki eta 2 mL-tara eramaten da. Funtzionalizazioa burutzeko, mikrozentrifugaziorako hodi batean MNPen azaleraren nm^2 bakoitzeko 50 PMAO monomero egoteko kopolimero disoluzio nahikoa jartzen da. Disoluzioari MNP koloidearen 2.5 µL-tantak gehitzen zaizkio, 1 mg MNP gehitu arte (50 µL), adizio bakoitzaren hostean nahastea sakabanatzen delarik. Nahastea 30 minutu uzten da ultrasoinutan eta disolbatzailea hutsean lurruntzen da, 40ºC-ko tenperaturan. Hauspeakina 4 mL $CHCl_3$-tan sakabanatu eta berriro ere disolbatzailea hutsean lurruntzen da. Ondoren, hauspeakina 1 mL SBBS (*sodium borate buffer*, pH=9.45) eta 1 mL H_2O-tan sakabanatu eta nahastea zentrifugatu egiten da (30 minutu, 14000 RPM). Azkenik, MNPak 2 mL H_2O-tan sakabanatzen dira, 0.5 mg/mL-ko MNP kontzentrazioa eskuratuz (Castellanos-Rubio et al., 2020).

Bi laginek tamaina desberdina dutenez, M2 lagina funtzionalizatzeko, 10 kDa-eko PEGa erabili da, M4 laginaren kasuan 5 kDa-eko PEGa erabili den bitartean. Izan ere, NPak handiagoak direnean, luzera handiagoko polimeroak behar dituzte suspentsioan egonkorrak izateko (Saville et al., 2013). Funtzionalizatutako laginen tamaina hidrodinamikoa (D_H) *dinamic light scattering* (DLS) teknikaren bidez lortu da (2. Taula). Lehenik eta behin, *M2-PEG-L1* eta *M4-PEG-L1* laginak prestatu ziren. Aurreko lanetan ikusitakoaren arabera, bi lagin hauen D_H-a handiegia dela ondorioztatu da (Barón, 2020). Honen arrazoia NPei lotutako gehiegizko materia organikoan dago. Izan ere, polimeroa materia organiko honi atxikitzen zaio, eta gehigizkoa bada, NP multzoak sortu daitzeke. Beraz, laginak optimizatzearren, $CHCl_3$-tan zeuden MNPak berriro ere 3 aldiz garbitu ziren, jadanik aipatutako prozedura erabiliz, eta funtzionalizazioa errepikatu zen, *M2-PEG-L3* eta *M4-PEG-L3* laginak ekoiztuz. Hobekuntza nabaria da, behatu 2. taula. Ikusten denez, nahiz eta NPen tamaina desberdina izan, bi NP laginen prestaketen D_H-a oso antzekoa da. Baliteke M4, bere tamaina txikiagoa izanda, funtzionalizazioa burutzean estalpen kolektiboak ematea, NP klusterrak sortuz. Ondorioz, lagin horrek elkarrekintza dipolar gehiago izango ditu M2-ren prestaketak baino. Beraz, azken honen hipertermiarako errendimendua baxuagoa izan beharko litzateke.

2. Taula. M2 eta M4 laginen materia organiko kantitatea, TEM tamaina eta D_H.

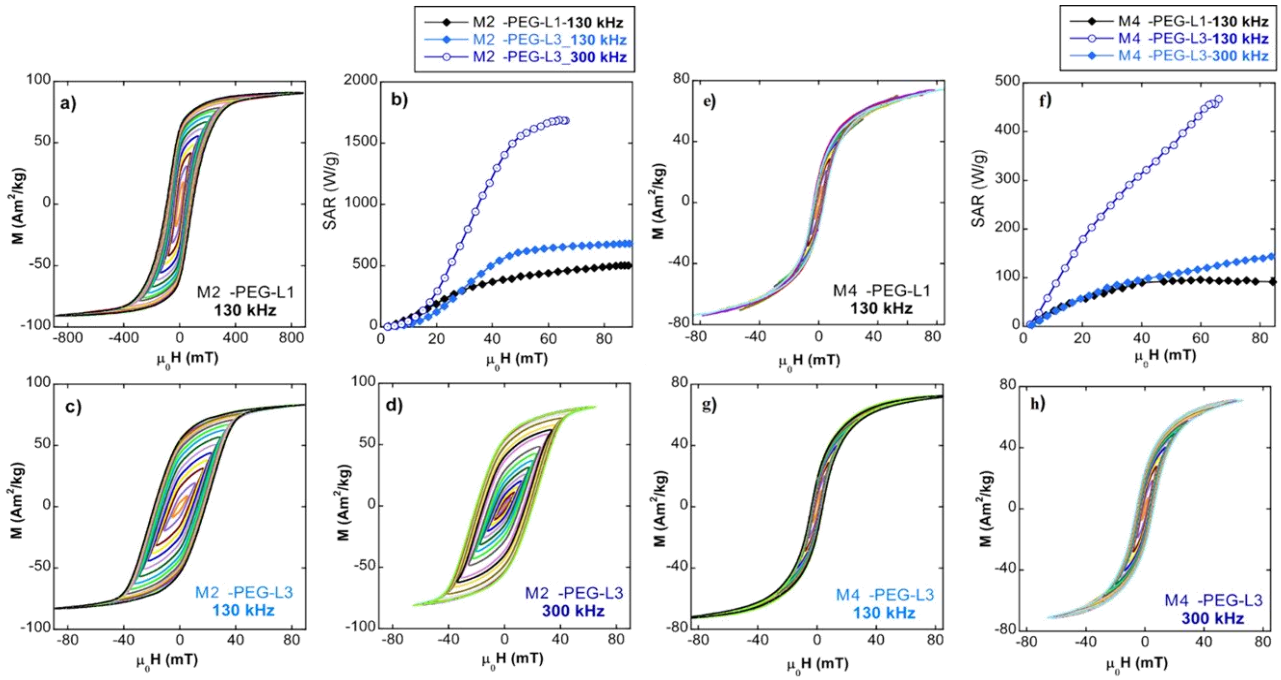
Lagina	M.O. (% masa)	D_{TEM} (nm)	D_H (nm)
M2-PEG -L1	35	25 ± 2	110 ± 20
M2-PEG -L3	12	25 ± 2	74 ± 1
M4-PEG-L1	33	18 ± 2	120 ± 19
M4-PEG -L3	8	18 ± 2	73 ± 3

4.3. Hipertermia Magnetikoa

AC magnetometria erabiliz, funtzionalizatutako laginen histeresi-zikloa eta SARa neurtu da. Horretarako, 100 mg/mL-ra kontzentratutako NP ur koloide 50 µL eta 50 µL PBS (*phosfate buffered saline*, pH=7.45) nahastu dira. Neurketak 90 mT-ko eremua erabiliz burutu dira eta maiztasun bi frogatu dira, bata baxua, 130 kHz eta bestea altua, 300 kHz, biak erabilpen medikoetarako aproposak (Rodrigo et al., 2020). Emaitzak 2. irudian ikusi daitezke.

M2 eta M4 laginen datuak erkatzerakoan, ikusten da M2 laginen histeresi-zikoak askoz zabalagoak direla, aurretik azaldu den moduan, M4 laginek elkarrekintza dipolar gehiago jasango dituztelako eta Ms baxuagoa aurkezten dutelako. M2 laginei erreparatuz, ikusten da nola funtzionalizazioa egiterakoan materia organiko gutxiago zuten laginek histeresi-ziklo zabalagoak ematen dituztela, SAR kurbetan islatzen dena. Izan ere, optimizatutako M2 laginek SAR balio altuagoak erakusten dituzte. Saturazioa 50 mT inguruan lortzen da eta 300 kHz-eko maiztasunarekin SAR balio oso ona lortzen da, 1700 W/g.

2. Irudia. M2 eta M4 laginen histeresi zikloak AC eremuan eta SAR kurbak. a) M2-PEG -L1, 130 kHz. b) M2 laginen SAR kurbak. c) M2-PEG-L3, 130 kHz. d) M2-PEG-L3, 300 kHz. e) M4-PEG-L1, 130 kHz. f) M4 laginen SAR kurbak. g) M4-PEG-L3, 130 kHz. h) M4-PEG-L3, 300 kHz.



5. Ondorioak

Fe(oleato)$_3$ aurrekari metal-organikoa ekoiztu eta honen deskonposaketa termikoaren bidez, nahierako Fe_3O_4 NPak sintetizatu daitezkeela frogatu da. Bestetik, funtzionalizazioa optimizatu da. PMAO-PEG kopolimeroa erabiliz, ingurune fisiologikoan egonkorrak diren MNPak lortu dira. Azkenik, frogatu egin da lortutako NP-polimero prestaketak hipertermia magnetikoa gauzatzeko gai direla. Sekulako emaitzak lortu dira eta esan daiteke, lortutako sistemak kantzerraren aurkako terapietan erabiltzeko bidean daudela.

6. Etorkizuna

Azaldutako prozedurari dagokionez, bai burdina oleatoa, bai NPak ekoizteko eta hauek funtzionalizatzeko metodologia finkatu egin da. Burdina oleatoaren egitura eta konposizioa ez da guztiz errepikakorra, infragorri (IR) espektroskopiaren bidez egindako azterketak lagungarriak izango lirateke. Honek sintesiaren kontrola handiagotuko luke. Bestalde, M2 lagina apartekoa da, lagin honen erreplika gehiago egin beharko liratezke, metodoaren errepikakortasun

totala frogatzeko eta bestetik, lagin honen ioien estekiometria eta disposizioa egituran zehar aztertzeko. Horretaz gain, Fe_3O_4 NPen ezaugarriak bere sarean bestelako metalak gehituz aldatu daitezke. Adibidez, Zn-ak Ms-a handitu dezake, beraz dopatutako magnetita ekoiztea abantailak ekarri ditzake. Funtzionalizazioari dagokionez, lehenago aipatu den bezala, posible da erabilitako polimeroak aldez aurretik eraldatzea, fluoreszentzia emititzen duten NPak lortzeko edota hauek ehun edo zelula konkretuetara bideratzeko, antigorputzak edo proteinak baliatuz. Beraz, bi eraldaketa hauek gauzatzeko molekulak eta kimika organikoa jadanik aztertzen ari dira.

7. Erreferentziak

- Barón, A. (2020), *Preparación de Nanoplataformas Multifuncionales Basadas en Nanopartículas de Fe_3O_4 para su Aplicación como Agentes Teranósticos,* UPV-EHU, Leioa.
- Castellanos-Rubio, I. et al. (2019), *Nanoscale*, 11, 16635–16649.
- Castellanos-Rubio, I. et al. (2020), *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 12, 27917-27929.
- Chen, W. et al. (2019), *Am. Chem. Soc*., 141, 12475.
- Cornell, R. M. eta Schwertmann, U. (2003), *The Iron Oxides*, 2. Ed., Wiley-VCH Verlag GmbH & Co, Weinheim.
- Dixit, G. et al. (2012), *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 324, 479.
- Gatteschi, D. et al. (2012), *Angewandte Chemie*, 51, 4792.
- Harabech, M. et al. (2017), *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 426, 206–210.
- Hufschimd, R. et al. (2015), *Nanoscale*, 7, 11142.
- Keywan, M. et al. (2021), *Life Sciences*, 269, 119020.
- Lahiri, B. B. et al. (2017), *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 441, 310–327.
- Maity, D. et al. (2012), *Chemical Communications*, 48, 11398.
- Maldonado-Camargo, L. et al. (2016) *Mag. Mag. Mat.*, 412, 223–233.
- Mejias, R. et al. (2019), *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 11, 1, 340–355.
- Menéndez-Miranda, M. et al. (2016), *Analyst.*, 141, 1266-1272.
- Paliwadana-Arachchige, M. et al. (2017), *Gd-Doped Superparamagnetic Magnetite Nanoparticles for Potential Cancer Theranostics*, Intech.
- Rai, M. eta Kon, K. (2015), N*anotechnology in Diagnosis, Treatment and Prophylaxis of Infectious Diseases*, Elsevier.
- Rodrigo, I. Et al. (2020), *International Journal of Hyperthermia*, 37. 976-991.
- Sánchez, C. (2013), *Rev. Med. Clin. Condes.*, 24, 4, 553-562.
- Sangnier, A. P. et al. (2019), *Nanoscale*, 11, 16488–16498.
- Sanjay, S.S. and Pandey, A.C. (2017), *Adv. Struct. Mat.*, 62, 47- 63.
- Saville, S. L. et al. (2013), Nanoscale, 5, 2152.
- Smit J. eta Wijn H. P. J. (1959), *Ferrites. Physical properties of ferrimagnetic oxides in relation to their technical applications*, Willey: New York.
- Stark, W. J. (2011), *Angew. Chemie*, 50, 1242 – 1258.

8. Eskerrak eta Aipamenak

Aurkeztutako ikerketa master amaierako lan batetik eratorria da (Barón, 2020), Leioako Zientzia eta Teknologia Fakultateko (FCT-ZTF) eta Kantabriako Unibertsitatearen (UC) arteko Material Berrien Masterraren barruan burututakoa.

Egindako neurketa magnetikoak Leioako Zientzia eta Teknologia Fakultateko (FCT-ZTF) analisi zerbitzu orokorrean (SGIker) burutu dira, Iñaki Orue-ren laguntzarekin.

Lan hau Eusko Jaurlaritza-ren eta Zientzia eta Berrikuntza Ministerioaren hurrenez hurreneko GU_IT1226-19, Elkartek 20/06 eta PID2019-106845RB-100 proiektuen pean finantzatu da.

Polimero biobateragarrien garapena biomedikuntzan erabiltzeko

Sánchez-Bodón, J.[1], Veloso, A.[1], Ruiz-Rubio, L.[1,2], Pérez-Álvarez, L.[1,2], Laza, J.M.[1], Moreno-Benítez, I.[3] eta Vilas-Vilela, J.L.[1,2]

[1]*Kimika Makromolekularreko Laborategia, Kimika Fisikoa Saila, ZTF/FCT (UPV/EHU)*
[2]*Basque Center for Materials, Applications and Nanostructures (BCMaterials), Bizkaiko Zientzia eta Teknologia Parkea*
[3]*Kimika Makromolekularreko Laborategia, Kimika Organikoa eta Inorganikoa Saila, ZTF/FCT (UPV/EHU)*

antonio.veloso@ehu.eus

Laburpena

Plastiko biobateragarrien garapenak erronka zientifikoa izaten jarraitzen du biomedikuntzan material hauek erabili ahal izateko. Polimeroen artean, poliuretanoak (PUak) oso erabiliak dira eta gainera azken urteetan forma-memoria duten PUak asko garatu dira. Hauek estimulu baten aurrean forma aldatzeko gaitasuna dute eta horrela, beste polimero batzuekin lor ezin daitezkeen aplikazioetan erabilgarriak izan daitezke. Izan ere, gaur egun ingurumena kaltetzen ez duten materialen sintesian oraindik garapen asko falta da. Lan honetan, biobateragarriak diren forma-memoria PUetan sakonduko da.

Hitz gakoak: poliuretanoak, forma-memoria polimeroak, biobateragarritasuna, toxizitatea.

Abstract

The development of biocompatible plastics remains a scientific challenge for the use of these materials in biomedicine. Among them, polyurethanes (PUs) are widely used and, in recent years, PUs with shape memory have developed a lot. These have the ability to change the shape before a stimulus and can be useful in applications that cannot be achieved with other polymers. In fact, much development is still lacking in the synthesis of materials that currently do not harm the environment. This work will delve into the biocompatible shape memory PUs.

Keywords: polyurethanes, shape memory polymers, biocompatibility, toxicity.

1. Sarrera eta motibazioa

Plastikoen inguruan dagoen eztabaida handia izan arren, gaur egun ezinezkoa da eguneroko bizitza plastikorik gabe garatzea. Plastikoak zenbait arlotan erabiltzen diren materialak dira eta haren erabilpena biomedikuntzan gero eta gehiago zabaltzen ari da. Esaterako, hasiera batean protesiak egiteko metalak erabiltzen ziren, baina orain merkatuan dauden inplante kirurgiko gehienak polimerikoak dira, merkeagoak eta askoz errazago prozesatzen direlako. Hala ere, gure gorputzean plastiko bat sartzeko biobateragarria eta toxikoa ez izatea beharrezkoa da. Beraz, biobateragarriak eta ez toxikoak diren material polimerikoen ikerketa bermatzea ezinbesteko erronka da. Bestalde, forma-memoria duten polimeroak, hots, kanpoko estimulu baten ondorioz forma aldatzeko gaitasuna azaltzen duten materialek, oso erakargarriak bilakatu dira azken urteetan. Izan ere, ezaugarri honek aplikazio askotarako erabilgarriak izatea eragiten du.

Poliuretanoak (PUak) gaur egun asko erabiltzen diren konposatuak dira eta ingurumena errespetatzeko eta ez kaltetzeko aukera daukate (Garside, M. 2020). Bestalde, forma-memoria poliuretanoek (SMPUak) forma-memoria ezaugarri hobe ezinak azaltzen dituzte. Beraz, lan honetan forma-memoria duten PU biobateragarrietan sakonduko da.

2. Arloko egoera eta ikerketaren helburuak

Lan honen helburua PUak nola sintetizatzen diren azaltzea da. Horretarako, PU hainbat sintesi erakutsiko dira. Ondoren, forma-memoria efektua zer den eta modu sinplean aztertzeko eta ebaluatzeko analisi termomekanikoa (TMA) eskainiko da. Azkenik, biobateragarritasuna zer den azalduko da eta zitotoxizitatea analizatzeko modu bat aurkeztuko da.

Lehenengo PUen sintesia aurkeztuko da, ondoren forma-memoria zer den eta nola ematen den azalduko da azterketa termo-mekanikoa (TMA) erabiliz. Azkenik, biobateragarritasun kontzeptuak zer esan nahi duen aztertuko da eta bromuro 3(4, 5 dimetil-2-tiazoil)-2,5-difeniltetrazolikoaren (MTT) erredukzioaren bidez bideragarritasun zelularra ikertuko da. Azterketa horietan lortutako emaitzak aztertu ondoren, prestatutako laginak biomedikuntza aplikazioetan egokiak diren edo ez determinatuko da.

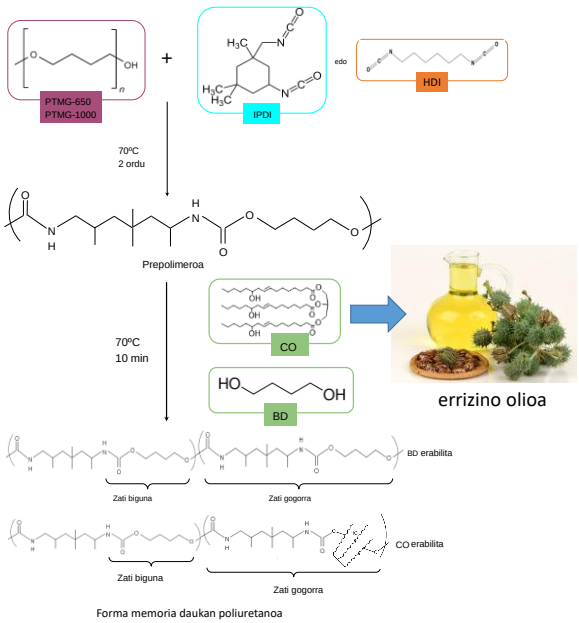
3.1. Poliuretanoen sintesia

PU taldea eratzeko hiru erreaktibo erreakzionarazten dira: poliola (-OH talde erreaktiboa daukana), diisozianatoa (zianato talde erreaktiboak izanda, -N=C=O), eta kate hedatzailea (baita hidroxilo talde erreaktiboak ere daukana, -OH). Osagai guzti hauek elkartzen dira polimero bat sortzeko, non bi segmentu bereizten diren: segmentu zurruna diisozianatoz eta kate hedatzailez osatuta dagoena, eta bestetik segmentu biguna, poliolez osatuta. Segmentu hauek txandaka ordenatzen dira. Erreaktiboen proportzioak aldatuz, propietate desbedineko polimeroak daitezke, hau da, zurruntasun eta malgutasun desberdineko materialak lortzen dira. 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 erreaktibo guztiak aldi berean nahastuz. Prepolimeroaren metodoan, aldiz, lehendabizi diisozianatoa eta makrodiola erreakzionarazten dira nahaste likatsua lortuz, ondoren kate hedatzailea gehitzen da poliuretanoa lortzeko.

Lan honen sintesia egiteko erabilitako erreaktiboak hauek izan dira: pisu molekular desberdineko hiru politetrametilenglikol (PTMG) poliolak (250 g/mol (PTMG250), 650 g/mol (PTMG650) eta 1000 g/mol-ekoak (PTMG1000)); isoforona diisozianatoa zikloalifatikoa (IPDI) eta hexametilo diisozianato alifatikoa (HDI); eta 1,4-butanodiola (BD) eta errizino olioa (CO) kate hedatzaile gisa. Sintesia 1. irudian eskematikoki erakusten da. Gainera, CO Indian jatorria daukan *Ricinus communis* zuhaixka-formako landarearen hazitik eskuratzen den olioa da. Landare pisuaren %40-50 gutxi gorabehera olioa da, eta olio honen %70-77 azido errizinoleikoz eratutako triglizeridoz osatuta dago. Beraz, erreaktibo hau iturri natural batengandik eratorria da.

Erreaktibo hauen nahaste konposizioa aldatuz, propietate anitz dituzten PUak sintetizatu dira, segmentu zurrun-bigun konposizioa aldatzen baita. Horrela, izango duen erabilerarako optimoa den nahastea eta konposizioa duen konposatua zein den determinatzen saiatuko da. Modu honetan, konposizio desberdineko PUak alderatuz forma-memoria hoberena erakusten eta biobateragarritasun handiena azaltzen duen materiala aztertu da.

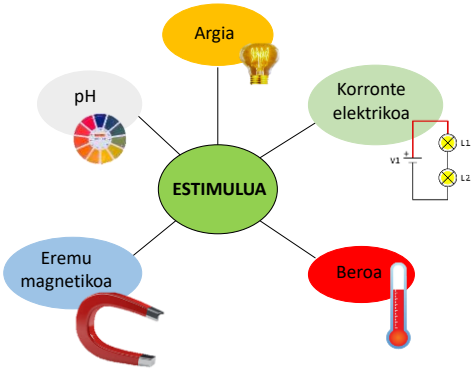
1. irudia. Forma-memoria duten poliuretanoen sintesia



3.2. Forma-memoria efektua eta azterketa termo-mekanikoa

Material batek forma-memoria duela esaten da deformatzean, deformazio hori denbora jakin batean mantentzen badu eta estimulu bat aplikatuz hasierako forma berreskuratzen badu. 2. irudian ikusten den modura, forma aldaketa hau estimulu ezberdinen bidez eragin daiteke, hala nola, beroa, argia, hezetasuna, elektrizitatea, magnetismoa, presioa, tentsioa edo pH (Huang et al., 2011).

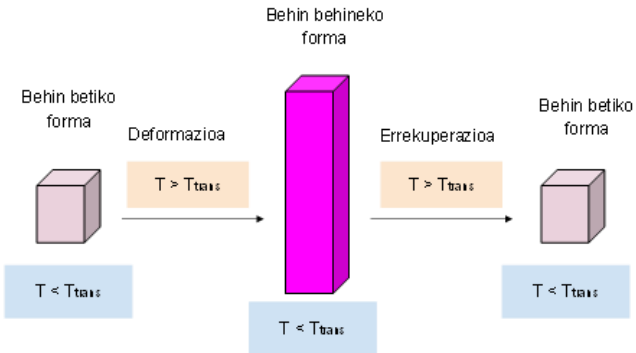
2. irudia. Forma-memoria efektua lortzeko erabiltzen diren estimuluak



Sintetizaturiko poliuretanoen forma-memoria behatzeko azterketa termo-mekanikoa (Thermomechanical Analysis, TMA) teknika erabiltzen da. Izenak adierazten duen moduan, tenperatura jakin batean eta indar bat aplikatuz (edo indarrik gabe), materialak azaltzen duen tamaina edota propietate mekanikoaren aldaketa aztertzean datza. Horretarako, DMA-1 Mettler Toledo ekipoa erabili da trakzio moduan. Orokorrean, forma-memoria efektua aztertzeko erabiltzen den kanpo estimulu ohikoena beroa da (Cuevas, 2011), modu honetan materialak tenperatura batean egitura aldaketa 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 gainetik edo azpitik gertatuko dira. Forma-memoria efektua agertzen da materialaren egituran bi fase aurkitzen direlako. Fase batek polimero sare egonkorra osatzen du eta hasierako forma ezartzen du materialean. Bigarren fasea, fase itzulgarria da eta trantsizio-tenperaturaren azpitik materiala denbora tarte batean forma bat mantentzeaz arduratzen da. Teknika honek laginak jasandako deformazioa, finkapena eta berreskurapena ehunekoetan kalkulatzea ahalbidetuko du.

Erabiltzen den metodoari dagokionez, lehenengo eta behin, laukizuzen formako lagin bat (1,5 x 5 x 5 mm^3 bolumena) 1 minututan zehar berotu egiten da, trantsizio tenperaturaren gainetik eta inongo indarrik aplikatu gabe. Ondoren, tenperatura konstantepean 2 N-eko indarra ezartzen da 5 minututan zehar, laginaren luzaketa eraginez. Momentu horretan, luzapen maximoa neurtzen da. Gero, indarra konstante mantenduz, lagina azkar hoztu egiten da (20°C/min-tan), T_g baino balio baxuago batera eramanez eta horrela behin behineko forma finkatuz. Lagina hoztu denean, indarra kendu egiten da eta baldintza hauek 5 minututan zehar mantentzen dira. Azkenik, lagina berriro T_g balioaren gainetik berotzen da, forma-memoria ezaugarria aktibatzeko eta laginak hasierako forma berreskuratu dezan. 3. irudian, forma-memoria termikoaren eskema erakusten da.

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



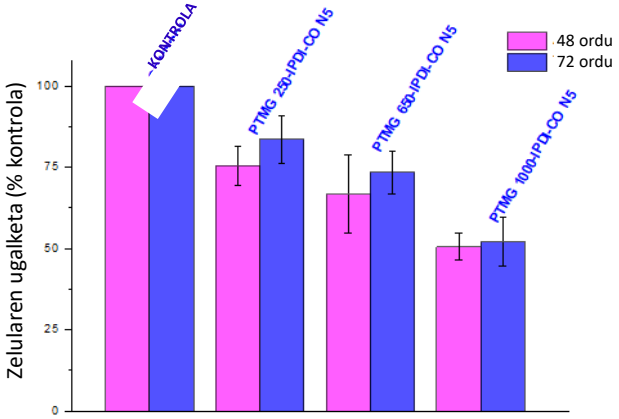
Sintetizatutako PU guztietan, deformazioa % 7-15 artekoa izan zen, finkapena % 90 baino altuagoa eta berreskurapena % 95 gorakoa. Beraz, esan dezakegu gure lagin guztiak forma-memoria efektua dutela.

3.3. Biobateragarritasuna

Biobateragarritasuna "bio", grekozko bizitza edo izaki bizia, eta "bateragarritasun", honekin egoteko gaitasun hitzeetatik dator. Nahiz eta kasu batzuetan biodegradagarritasun terminoarekin nahasi, biobateragarritasuna material batek ingurune biologiko batean (gizaki edo beste izaki bizidun batean) jarduteko eta erantzun egokia emateko duen gaitasuna bezala definitzen da. Biodegradagarritasuna, ostera, material batek degradatzeko duen ahalmena da. Prozesu natural honetan material bat eragin biologiko baten bidez aldatu egiten da, eta aldaketa hauen ondorioz normalean bere jatorrizko propietateak galtzen ditu. Kimika mailan, polimeroa osatzen duten molekulak forma sinple eta egonkorretara eraldatzen dira. Horrela karbonoz osatutako materialak egoera oxidatuenera (CO_2), egoera erreduzituenera (CH_4) edo bien nahasketara eraldatzen da. Eragile biologiko desberdinak ezagutzen dira, hala nola, landare, animalia, mikroorganismo edota onddoak, hauek edozein material organiko degrada dezakete ingurune egoeratan. Agente biologiko horiek materiala substratu moduan erabiliko dute, karbono edo beste elikagaien iturri bezala.

Polimeroei dagokionez, hauek sustantzia organikoak dira, lehengai sintetiko edo naturalen arteko erreakzio kimikoen ondorioz lortzen direnak. Itxura askotan moldatuak eta prozesatuak izan daitezke, presioa eta tenperaturaren eraginez. Biopolimeroak, bere izena esaten duen moduan, oinarri biologikoa duten polimeroak dira. Material hauen segmentu bat, gutxienez, biomasatik eratorria izan behar da, hots, landare, animalia, onddo edo bakterioetatik sortua izan behar da. Lan honetan, landare baten jatorria duen errizino olio esentziala erabili da, (Furtwengler et al., 2018) eta lortutako polimeroen biobateragarritasuna aztertu da.

4. irudia. Zitotoxizitatearen emaitzak



Sintetizatutako materialen zitotoxizitatea aztertzean, lehendabizi kate hedatzailearen efektua behatu da. Butanodiolarekin lortutako materialak, errizino olioarekin lortutakoak baino toxikoagoak dira. Beraz, CO daukaten PUak analizatzen jarraitu da, hauek interes handiena erakusten duten materialak baitira. Bestaldetik, IDPI eta HDI diisozianatoen kasuan, zitotoxizitatea antzekoa dela ikusi da. Azkenik, erabili diren pisu molekular desberdineko PTMG guztietan ez direla zitotoxikoak ikusi da, hau da, guztietan zelularen ugalketa %50 baino handiagoa da kontrol zelulekin alderatuta (4. irudia). Hala ere, hoberenak PTMG250 direla behatu da, non zelularen ugalketa %75 baino handiagoa da 48 ordu pasa ondoren.

4. Ondorioak

Sintetizatutako PU guztiek forma-memoria egokia erakusten dute eta T_g desberdinak lortu dira. PTMG balioa aldatzean PUak ez direla zitotoxikoak ikusi da. Honek materialaren segmentu bigunaren pisu molekularra aldatzea ahalbidetzen du eta materialak malguagoak edo zurrunagoak sortzeko aukera ematen du. Hala ere, PTMG txikiena duten PUak zelulen ugalketa hobea bermatzen dute. Bestalde, erabili diren diisozianatoak ere zitotoxizitate ona erakutsi dute.

Kate-hedatzailearen kasuan ez da gauza bera gertatu eta jatorri naturala duen CO erabiltzea komenigarriagoa dela behatu da. Beraz, material hauen sintesirako errizino olioa egokiagoa dela ondorioztatzen da. Modu honetan, esan daiteke forma-memoria duten PU biobateragarriak lortu direla. Sintetizaturiko laginen artean, forma-memoria eta toxizitatearen ikuspuntutik egokiena PTMG250-IPDI-CO lagina dela determinatu da.

5. Etorkizunerako planteatzen den norabidea

Lan honetan PUen forma-memoria eta zitotoxizitatea aztertu da emaitza ezin hobeak lortuz.Hala ere, biodegradagarritasuna beste aldagai garrantzitsua da eta oraindik lan handia egin behar da PUak sortzeko jatorri naturala duten erreaktibo ez toxikoak erabiltzean. Beste aldetik, polimero hauen beirazko trantsizio-tenperatura kontrolatzea beste erronka bat izango da. Forma-memoria, biobateragarritasuna, biodegradagarritasuna eta beirazko trantsizio-tenperatura guztiz kontrolatuz, material hauen etorkizuna eta aplikazioak esponentzialki barreiatuko dira.

6. Erreferentziak

Cuevas, J. (2011): *Desarrollo y caracterización de la capacidad de memoria de forma en polímeros semicristalinos*, Doktoretza tesia, Euskal Herriko Unibertsitatea, Leioa.

Furtwengler, P., Avérous, L. (2018), Renewable Polyols for advanced polyurethane foams from diverse biomass resources, *Polymer Chemistry*, 9, 4258-4287.

Garside, M. (2020): *Polyuretane demand worldwide from 2012 to 2024 (in million tons)*, [https://www.statista.com/statistics/747004/polyurethane-demand-worldwide/]

Huang, W., Yang, B., Yong, Q. (2011): *Polyurethane Shape Memory Polymers*. CRC Press. Boca Ratón, Florida, Estatu Batuak.

7. Eskerrak eta oharrak

Egileek erakundeek (UPV/EHU eta GV/EJ) emandako laguntza (ELKARTEK programa, IDEA, AVANSITE, µ4Indust) gizatiarra eskertzen dute.

Ontze denborak zaldi-haragian duen eragina: kontsumitzaileen iritzia

Beldarrain, L.R.[1], Etaio, I.[1,2], Barron, L.J.R.[1], Insausti, K.[3] eta Aldai, N.[1]

[1]Lactiker Ikerketa Taldea - Euskal Herriko Unibertsitatea (UPV/EHU), Gasteiz, [2]Laboratorio de Analisis sensorial Euskal Herriko Unibertsitatea (LASEHU), Gasteiz, [3]IS-FOOD, Nafarroako Unibertsitate Publikoa (UPNA), Iruña
lorea.rivera@ehu.eus

Laburpena

Zaldi-haragiak osasunari eta ingurumenari lotutako zenbait abantaila eskaintzen ditu eta horregatik ekoizpenak gora egin du. Espainiar estatuan haragi-ekoizpenerako zaldi gehienak ipar-mendebaldean kokatutako bailara eta mendietako larreetan hazten dira. EAEn zaldi-haragia ekoiztu eta merkaturatzeko potentzialtasuna badago, baina bere kontsumoa ez dago hedatua. Gainera, orokorrean, zaldi-haragiaren inguruko ikerketa gutxiago dago beste haragi mota batzuekin alderatuta. Ikerketa honetan zaldi-haragiaren ontze prozesua hutsean (4 °C eta ilunpetan) aztertu da: alde batetik, samurtasunean duen eragina instrumentalki neurtu da, eta bestetik, onarpenean duen eragina ebaluatu da kontsumitzaile ikerketa baten bitartez. Samurtasunaren handipena eta onarpenaren hobekuntzagatik ontze prozesuaren iraupen optimoa 7 egunekoa dela ondorioztatu da.

Hitz gakoak: moxal haragia, haragiaren samurtasuna, ekoizpen-sistema estentsiboa, kontsumitzaileen onarpena, haragiaren ontzea

Abstract

Horse meat production is slowly increasing due to its nutritional and environmental benefits. Most of the horses that are bred for meat production in Spain are raised in mountain and valley grasslands from the north-western regions. Basque Country has the potential to produce and market horse meat, but it is not popular in the region. In general, few studies have addressed the issue of horse meat quality compared with other types of meat. In the present study, vacuum aged horse meat (4 °C in the dark) was studied. The effect of ageing was evaluated on instrumental tenderness and on consumer acceptability by means of a consumer study. The optimum period of ageing was stablished at 7 days due to the improvement of tenderness and acceptability scores.

Keywords: foal meat, meat tenderness, extensive production system, consumer acceptability, meat ageing

1. Sarrera eta motibazioa

Zaldi-haragia historiaurretik kontsumitu den arren, hainbat faktorek eraginda, hots, erlijiosoak, sozialak eta kulturalak, okel horren kontsumoa eten egin da momentu askotan (Kalenka, 2009). Beste espezieetako haragiarekin alderatuta, zaldi-haragiaren kontsumoa mundu mailan ez da altua: % 0,22 2019an, Nazio Batuen Elikadura eta Nekazaritza erakundearen arabera (FAO, 2021). Hala ere, hainbat ikerketa-lanek azpimarratzen dutena kontuan hartuz gero, etorkizun oparoa duen proteina-iturria da.

1. irudia. Zaldiak Aralarko Natur Parkeko larretan bazkan. Autoreen jabetzako irudia.

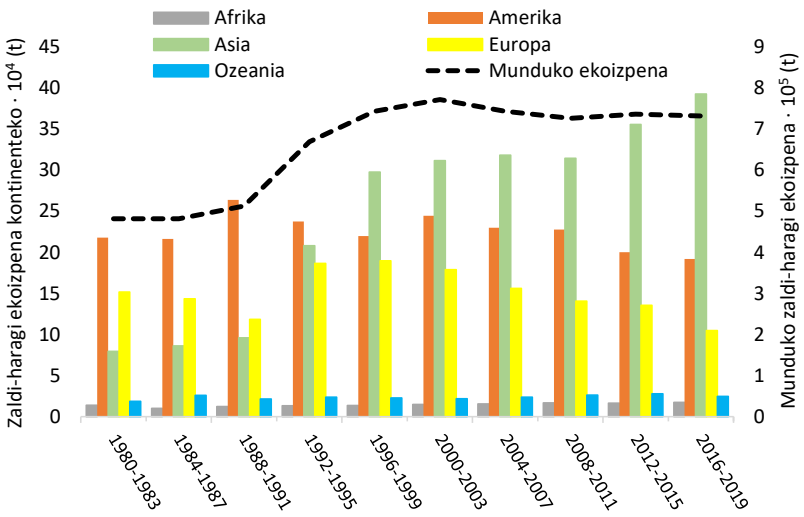
Zaldi-haragiak, zenbait abantaila ditu; alde batetik, gantz azido poli-asegabeen kopurua altua izanik, eligakai osasuntsua da (Belaunzaran et al., 2017), eta bestetik, berotegi-efektuko gasen emisioa oso baxua da, hausnarkariak diren animaliekin alderatuta (Franz et al., 2010). Aipatutako abantaila hauek zaldiaren anatomiarekin daude erlazionatuta; alde batetik, zaldiek euren elikadurarekin barneratzen dituzten gantz azido gehienak heste mehean xurgatzen dira, geroago heste lodian edo hartzidura gunean gertatzen diren aldaketak jasan aurretik, eta bestetik, zaldia animalia monogastriko belarjalea izanik, bere digestio-sistemak metano gas gutxiago sortzen du.

Horrez gain, zaldien ohiko ekoizpen estentsiboak mendiko paisaiaren kontserbazioan laguntzen du (1. irudia). Helburu honekin mendiko larreetan bazkan aritzeko oso animalia egokiak dira, monogastrikoak izanda ere, zelulosa modu eraginkor eta azkarrean digeritzeko gai direlako. Gainera, haien tamainagatik bazka kantitate handiak barneratzen dituzte: eguneko orduen % 75 eta gaueko % 50 bazkan ematen dituztela kalkulatu da (Fleurenceet al., 2001). Honekin lotuta, zaldien ekoizpen-sistema estentsiboa baso-suteen prebentziorako tresna gisa ere proposatu da (Canals, 2019) eta mendi inguruetako biztanleriaren mantenuan laguntzen dezake (Insausti et al., 2021). Hortaz, produktuaz haratago, ekoizpen-sistemak berak ere hainbat abantaila eskaintzen dituela argi geratu da.

2. Arloko egoera eta ikerketaren helburuak

Zaldi haragiak eskaintzen dituen abantailak kontutan hartuta, haragi mota honen ekoizpenak astiro gora egin du mundu osoan azken hamarkadetan. Gaur egun Amerika eta Asia dira ekoizle nagusiak, eta Europako kontinenteak tarteko maila du (2. irudia). Espainiar estatuan ere bertako arrazetatik lortutako zaldi-haragiaren ekoizpenak gora egin du azken bi hamarkadetan. Arraza pisutsuen artean (behorraren pisua >650 kg), Hispaniar-Bretoi (Gaztela-Leonen, Kantabrian eta Aragoian), Burguete (Nafarroan), Euskal Herriko Mendiko Zaldia (EAEn eta Nafarroan) eta Kataluniako Pirinioetako Zaldia (Katalunian) nabarmentzen dira; tamaina ertainekoen artean (351-650 kg), Jaca Navarra (Nafarroan) eta animalia gurutzatuak; eta tamaina txikikoen artean (<350 kg), Galiziako Mendiko Zaldia (Galizian), Asturcón (Asturiasen), Losino (Gaztela-Leonen), Monchino (Kantabrian) eta Pottoka (EAEn eta Nafarroan). Arraza hauek baldintza klimatologiko gogorretara moldatzeko gaitasun handia dutenez, gehienetan ez da beharrezkoa izaten animaliak ikuiluratzea eta urte osoan zehar egon daitezke bailara edota mendiko larreetan bazkan. Soilik neguan, muturreko tenperaturak ematen badira, ikuiluratzen dira normalean eta denbora-tarte laburrez (Insausti et al., 2021).

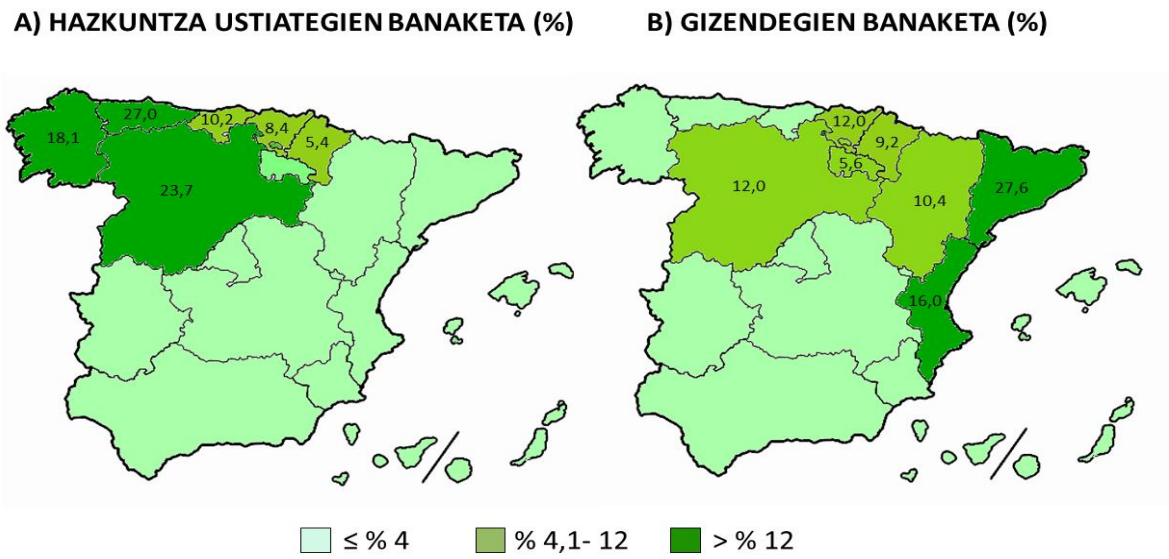
2. irudia. Zaldi-haragiaren ekoizpena (tonatan) kontinenteka (kolodun barrak, ezkerreko ardatza) eta mundu (marra ez-jarraitua, eskuineko ardatza) mailan, (FAO, 2021). Autoreen jabetzako irudia.



Estatu mailako zaldien banaketari erreparatuz, 2021. urtean erregistratutako 635.312 animalietatik (haragi-ekoizpenerako, aisialdirako edo kirolerako) gehienak hegoaldean eta mendebaldean daude kokatuta. Hala ere, estatuko ipar-mendebaldean (Gaztela-Leon, Asturias, Galizia Kantabria, EAE eta Nafarroa) kokatzen dira haragitarako zaldi ustiategi gehientsuenak (% 93) (3A. irudia). Eskualde hauetako ohiko ekoizpen sistema kontutan hartuta, moxalak jaio ondoren haien amekin hazten dira inguruko bailara eta mendiko larreak aprobetxatuz. Edoskitzea utzi eta hilabete batzuetara moxalak gizentzera eraman ohi dira, pisua irabazi eta gantza hartu dezaten. Gizendegi horietako zati garrantzitsu bat, % 54 alegia, penintsularen ipar-ekialdean dago (Katalunia, Valentzia eta Aragoi; 3B. irudia) (MAPA, 2021).

Datuotatik zera ondoriozta daiteke: animaliak jaio eta hazi diren eskualdeetatik (ipar-mendebaldea) gizentzera kanpora (ipar-ekialdea) eramaten direla eta, beraz, mugimendu horrekin jatorrizko eskualdeetan ekoizpen estentsiboarekin lortutako animalia edota haragiaren balio erantsia, hau da, horri lotutako bestelako onurak, galdu egiten direla nolabait.

3. irudia. Espainar Estatuko hazkuntza ustiategien (A) eta gizendegien (B) banaketa (%) 2021ean. (MAPA, 2021). Autoreen jabetzako irudia.



Modu estentsiboan hazi diren animalia horietatik lortutako bertoko elikagaiei balio erantsia ematea onuragarria litzateke ingurumenerako, ekoizleentzat eta landa-eremuetako ekonomiarentzat, eta zentzu honetan EAEn zaldi-haragia ekoiztu eta merkaturatzeko potentzialtasunaz ere hitz egin daiteke. Hala ere, gaur egun okel horren kontsumoa urria da EAEn, eta Lactiker ikerketa taldean Gasteizko inguruetako boluntarioei egindako galdeketa batean ikusi daitekeenez, galdetutakoen % 77-k ez du zaldi-haragia inoiz probatu edota oso gutxitan jan du. Beraz, zaldi-haragiari lotutako abantailak argiak diren arren, okel horren kontsumoa ez dago oraindik oso hedatuta. Horren arrazoiak bat baino gehiago izan daitezke baina haragi mota honen ezagutza mugatua eta erosketa gune urriak dira faktore garrantzitsuenetariko bi.

Ezagutza mugatua izateak, gehiago kontsumitzen diren haragiak baino ikerketa gutxiago izan dituela esan nahi du, eta beraz, beste haragi mota horietan gehien balioesten diren ezaugarriak zaldi-haragian ere ikertzea beharrezkoa dela esan liteke. Samurtasuna, adibidez,

kontsumitzaileak haragian gehien baloratzen dituen ezaugarrien artean dago (Banovic et al., 2009) eta jakina da hil osteko ontze prozesua dela okelaren samurtasunean eraginik handiena duen faktorea, kalitatean erabakigarriak izango diren aldaketa biokimiko konplexuak gertatzen baitira giharretan. Hau guztia kontutan hartuta, ikerketa honek kontsumitzaileak modu positiboan baloratuko duen kalitatezko zaldi-haragia ekoizteko ontze prozesua ikertzea izan du helburu. Honetarako, ontze prozesuak samurtasunean eta kontsumitzailearen ebaluazioan duen eragina aztertu dira.

3. Ikerketaren muina

3.1. Atal esperimentala

Hispaniar-bretoi arrazako 10 moxal (5 eme eta 5 ar) erabili ziren ikerketan. Jaiotzetik soilik amaren esnez hazi ziren, 6-8 hilabeterekin larrean amarekin bazkan hasi arte. Hil aurreko 100-120 egunetan pentsuarekin gizendu ziren gizendegi komertzial batean, 15-17 hilabeterekin Europako legediari jarraituz hil zituzten arte (Council regulation 1099/2009). Aste bakoitzeko bina zaldi (emea eta arra) hil ziren, bost astez.

Animalien kanalak hiltegian hotzetan 48 orduz eduki ondoren, animalia bakoitzaren bi solomoak (*Longissumus thoracis et lumborum* muskulua) laborategira eraman ziren. Bertan, zentimetro eta erdiko lodierako xerrak moztu, banaka hutsean ontziratu eta 0, 7, 14 eta 21 egunez ondu ziren. Ontze prozesua ilunpetan eta gela hotz batean (4 ºC) egin zen eta aurrez ezarritako egunera heltzean, xerrak izoztu egin ziren (-80 ºC). Kontsumitzaileekin egindako lanaren aurretik, 21 egunez ondutako zaldi-haragiaren azterketa mikrobiologikoa burutu zen bere segurtasuna bermatzeko.

Euskal Herriko Unibertsitateko Zentzumen Analisien Laborategian garatu zen kontsumitzaileekin egindako lana, eta ondutako zaldi-haragiaren onarpena eta deskribapena aztertu ziren. Bertara Gasteiz eta inguruko 120 boluntario hurbildu ziren ordubeteko saiotan parte hartzera. Saio bakoitzean xerrak plantxan prestatu ziren 71 ºC-ko barne tenperaturara heldu arte, gero laukitan moztu (2x1,5x2 zm^3), lauki bakoitza aluminio-paperean bildu eta beroa mantentzeko ontzietan mantendu ziren. Boluntario bakoitzak ontze denbora bakoitzeko lagin bat ebaluatu zuen. Laginak banaka aurkeztu zitzaizkien ausazko ordenan eta lagin artean ahoa garbitzeko ura eta gatzik gabeko cracker motako gailetak eman zitzaizkien.

Prozesu hau guztia birritan egin zen. Lehenengo aldian kontsumitzaileek haragiaren onarpena ebaluatu zuten ‘zenbateraino duzu gustuko xerra hau?’ galderari erantzunez, 10 zm-ko eskala batean ertz bkoitzean zm bat gehiagorekin). Bigarren aldian berriz, laginak CATA (Check-All-That-Apply) metodoaren bidez deskribatu zituzten. Metodo honetan kontsumitzaileei aurretik aukeratutako hitz zerrenda bat aurkeztu zitzaien (ehundura eta usaina/zaporea kategorietakoak) eta lagin bakoitza deskribatzeko hitz egokiak aukeratu zituzten.

Bestalde, zaldi haragiaren samurtasuna neurtzeko Warner Bratzler Shear Force deituriko instrumentua erabili zen (TA-XT2i, Stable Micro Systems). Xerrak, plastikozko poltsetan ontziratuta, ur-bainuan prestatu ziren 71 ºC-ko barne tenperaturara heldu ziren arte. Hoztu eta gero, xerra bakoitza muskulu zuntzekiko paralelo ebakitako zortzi laukitan (1x1x1,5 zm^3) banatu zen. Lauki horiek mozteko (300 N-eko zelula) erabilitako indar maximoa neurtu zen.

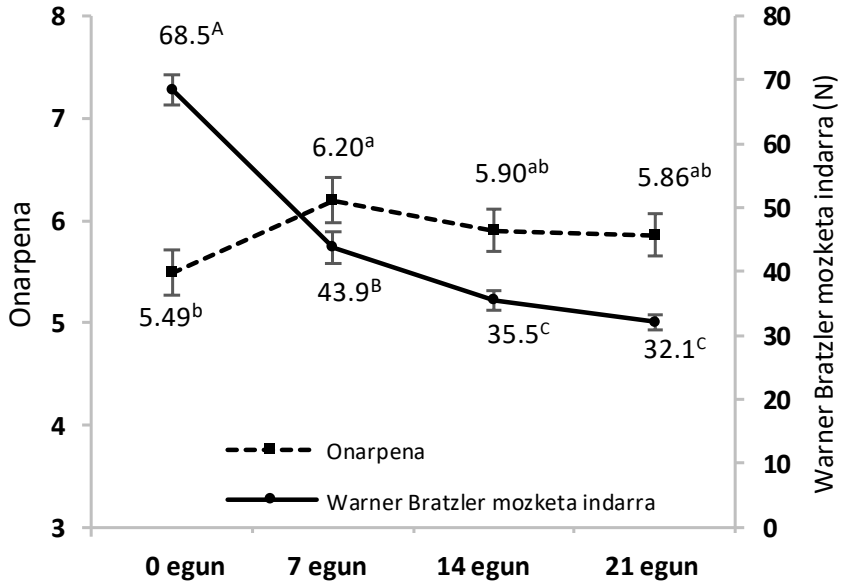
Analisi estatistikoa SPSS IBM Estatistika (v.25) programa erabiliz gauzatu zen. Onarpenean eta mozketa indarrean ontze prozesuak izandako eragina ebaluatzeko bariantzaren analisia (eredu lineal orokorra) egin zen eta modu adierazgarrian desberdinak izan ziren ontze denborak identifikatzeko Tukey testa ($p < 0,05$) erabili zen. CATA metodoaren bidez lortutako datu ez parametrikoen analisi estadistikoa egiteko ordea Cochran-en Q testa eta Mc’Nemar testa erabili ziren ($p < 0,05$).

3.2. Lortutako emaitzak

Kontsumitzaileek 7 egunez ondutako haragia hobeto baloratu zuten ondu gabekoa baino (4. irudia). Bestalde, denbora luzeagoz ondutako haragiek bitarteko puntuazioa lortu zuten. Beraz, kontsumitzaileen ikuspuntutik astebeteko ontzeak zaldi-haragiaren onarpena hobetu zuen. Aldiz, ontze prozesu luzeagoak ez zuen haragiaren balorazioa hobetu.

Bestalde, Warner Bratzler mozketa indarraren neurketaren arabera, balio altuek haragia gogorragoa dela adierazten dute, eta alderantziz. Mozketa indarraren emaitzak lagungarriak izan ohi dira kontsumitzaileen onarpen emaitzak eta hauen aldaketak azaltzeko. Izan ere, haragia oso samurra izateak era positiboan eragiten du kontsumitzaile gehienen balorazioan (Font-i-Furnols eta Guerrero, 2014; Robbins et al., 2003).

4. irudia. Ontze prozesuaren eragina kontsumitzaileen zaldi-haragiaren onarpenean (ezkerreko ardatza) eta Warner Bratzler mozketa indarrean (eskuineko ardatza). Zenbakien ondoan dauden hizkiak desberdintasun estatistiko esanguratsuen adierazle dira ($p < 0,05$).



Espero zen bezala, mozketa indarra jaisten joan zen ontze prozesua aurrera joan ahala. Izan ere, hil ostean, proteinen degradazioa dela eta, giharra samurtzen hasten da (Ouali et al., 2013; della Malva et al., 2019). Aipatutako mozketa indarraren balioen jaitsiera 0 eta 14 egunen bitartean eman zen eta 14 egunetik aurrera ez zen aldaketa esanguratsurik nabaritu (4. irudia). Zaldi-haragiaren kontsumitzaileen onarpena eta instrumentalki neurtutako mozketa indarra 0 eta 7 egunen artean, alderantziz erlazionatuta zeudela ikusi zen, baina 7 eta 14 egunen artean samurtasunaz gain beste ezaugarri batzuek eragiten zutela ondorioztatu zen, haragiaren samurtasuna handitu baina kontsumitzaileen onarpena hobetu ez zelako.

Zaldi-haragiaren onarpenean eragina izan zezaketen beste ezaugarri batzuk ezagutze aldera, CATA metodoaren bitartez kontsumitzaileek aukeratutako hitz garrantzitsuenak aztertu ziren. Horretarako, ontze denbora bakoitzeko haragia deskribatzeko erabili ziren hitzen aipamen maiztasuna jaso zen, hau da, zenbat kontsumitzailek markatu zuten hitz bakoitza (5. irudia).

Ehundura kategoriari dagokionez, ‘oso disolbagarria’ ‘samurra’ eta ‘urtsua’ hitzek joera berdina izan zuten, eta guztiak aipamen maiztasun baxuagoa izan zuten ondu gabeko laginetan ondutakoekin alderatuz, eta ez zen desberdintasunik antzeman ondutakoen artean. Bestalde, ‘asko murtxikatu beharra’, ‘gogorra’ eta ‘lehorra’ hitzek kontrako joera izan zuten, hots, ondu gabeko laginetan maiztasun handiagoa izan zuten. Emaitza hauek kontsumitzaileek 0 eta 7 egunez ondutako laginen arteko samurtasunaren hobekuntza antzeman zutela berretsi zuten, eta hori onarpen proban lortutako emaitzekin bat dator. Honek guztiak, ehundurarekin erlazionatutako ezaugarriek haragiaren onarpenean duten garrantzia ere nabarmendu zuen.

5. irudia Ontze prozesuaren eragina CATA hitzen zitazio maiztasunean. Zenbakien ondoan dauden hizkiak desberdintasun estatistiko esanguratsuen adierazle dira ($p < 0,05$).

KATEGORIA	CATA HITZAK	ZITAZIO FREKUENTZIA			
		0 EGUN	7 EGUN	14 EGUN	21 EGUN
Ehundura	Asko murtxikatu beharra	71^{a}	38^{b}	35^{b}	29^{b}
	Oso disolbagarria	20^{b}	44^{a}	48^{a}	45^{a}
	Gogorra	59^{a}	21^{b}	12^{b}	19^{b}
	Lehorra	63^{a}	46^{b}	44^{b}	45^{b}
	Samurra	14^{b}	45^{a}	53^{a}	52^{a}
	Urtsua	25^{b}	49^{a}	45^{a}	41^{a}
Usaina/ Zaporea	Bizia	24^{b}	28^{b}	35^{ab}	44^{a}
	Gibela	14	24	18	23
	Motela	43^{a}	36^{a}	26^{ab}	22^{b}
	Txigortua	23^{bc}	18^{c}	33^{ab}	39^{a}

Usain edota zapore kategorian ere aldaketak egotea espero zen, ontze prozesuak haragia prestatzen sortzen diren konposatu aromatikoetan eragina duelako (Watanabe et al., 2015). ‘Bizia’ eta ‘txigortua’ hitzek 21 egunez ondutako laginetan ondu gabekoetan baino aipamen maiztasun altuagoa izan zuten. Bestalde, ‘motela’ hitzak alderantzizko joera izan zuen. Azkenik, ‘gibela’ hitza ere aipatu zen arren, ez zen desberdintasun esanguratsurik aurkitu laginen artean.

4. Ondorioak

Lortutako emaitzek, samurtasunak zaldi-haragiaren onarpenean duen garrantzia berretsi dute. Emaitza horien arabera, zaldi-haragiaren ontze prozesuaren iraupen optimoa 7 egunekoa dela esan genezake. Ontze prozesu luzeagoek behar duten inbertsio ekonomikoa ez da justifikatzen ez duelako haragiaren onarpena hobetzen.

5. Etorkizunerako planteatzen den norabidea

Ikerketa lerro honen helburua zaldi-haragiak eskaintzen dituen abantailak eta EAEn tokiko eta kalitatezko zaldi-haragia ekoizteko aukerak ikustaraztea da. Hain zuzen ere, ontze prozesua ulertuz, zaldi-haragiaren kontsumoa indartuko duten estrategiak martxan jartzeko beharrezko ezagutza lortu nahi da. Lan honetan deskribatu diren saiakuntzak ontze prozesua ulertu ahal izateko lehenengo pausua izan dira. Hala ere, beste faktore batzuk ere ikertzea premiazkoa da. Honi lotuta beste zenbait ikerketa martxan dauzkagu; alde batetik ondutako haragian sortutako konposatu aromatikoak eta proteinen eboluzioa aztertzea eta bestetik, lipidoen ezaugarritzea eta eboluzioa aztertzea.

6. Erreferentziak

Banovic, M., Grunert, K.G., Barreira, M.M. eta Fontes, M.A. (2009). Beef quality perception at the point of purchase: A study from Portugal. *Food Quality and Preference*, 20, 335-342.

Belaunzaran, X., Lavín, P., Barron, L.J.R., Mantecón, A.R., Kramer, J.K.G. eta Aldai, N. (2017). An assessment of the fatty acid composition of horse meat available at the retail level in northern Spain. *Meat Science*, 124, 39-47.

Canals, R.M. (2019). Landscape in motion: revisiting the role of key disturbances in the preservation of mountain ecosystems. *Geographical Reseach Letters*, 45, 515-531.

Council regulation (EU) NO 1099/2009 of September 2009 on the protection of animals at the time of killing. *Official Journal of European Union*, 303, 1-30.

FAO (2021). Food and Agriculture Organization of the United Nations. Faostat, (http://www.fao.org/faostat/es).

Font-i-Furnols M. eta Guerrero, L. (2014). Consumer preference, behavior and perception about meat and meat products: An overview. *Meat Science*, 98, 361-371.

Franz, R., Solina, C.R., Kreuzer, M., Steuer, P. eta Clauss, M. (2010). Methane production in relation to body mass of rumminants and equids. *Evolutionary Ecology Research*, 12, 727-738.

Fleurance, G., Duncan, P. eta Mallevaud, B. 2001. Daily intake and the selection of feedingnsites by horses in heterogeneous wet grasslands. *Animal Research*, 50, 149–56.

Insausti, K., Beladarrain, L.R., Lavín, P., Aldai, N., Mantecón, A., Sáez, J.L. eta Canals. (2021). Horse meat production in northern Spain: ecosystem services and sustainability in High Nature Value Farmland. *Animal Frontiers* (*in press*).

Kalenka, P. (2009). *The horse in human history*. Cambridge University Press, Cambrige, UK.

della Malva, A., De Palo, P., Lorenzo, J.M., Maggiolino, A., Albenzio, M. eta Marino, R. (2019). Application of proteomic to investigate the post-mortem tenderization rate of different horse muscles. *Meat Science*, 157, 1078885.

MAPA, Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (2021). Informe SITRAN, Sistema General de Sanidad e Higiene Animal y Trazabilidad.

Ouali, A., Gagaoua, M., Boudida, Y., Becila, S., Boudjellal, A., Herrea-Mendez, C.H. eta Sentandreu, M.A. (2013). Biomarkers of meat tenderness: Present knowledge and perspectives in regards to our current understanding of the mechanisms involved. *Meat Science*, 95, 854-870.

Robbins, K., Jensen, J., Ryan, K.J., Homco-Ryan, C., McKeith, F.K. eta Brewer, M.S. (2003). Consumer attitudes towards beef and acceptability of enhanced beef. *Meat Science*, 652, 721-729.

Watanabe, A., Kamada, G., Imanari, M., Shiba, N., Yonai, M. eta Muramoto, T. (2015). Effect of aging on volatile compounds in cooked beef. *Meat Science*, 107, 12-19.

7. Eskerrak

Eskerrak Eusko Jaurlaritzako Ekonomiaren Garapena eta Azpiegitura Sailari L.R. Beldarrainen doktorego bekarengatik. Proiektu hau Lactiker ikerketa taldeak finantzatu du (Euskal Unibertsitate Sistemako Ikerketa Talde Finkatua; IT944-16).

Infusioen ahalmen antioxidatzailearen determinazioa Folin-Ciocalteu erreakzioa eta irudi digitalen analisi bidez

Ezenarro, J.; Bordagaray, A. eta García-Arrona, R.
Kimika Aplikatua Saila, Kimika Fakultatea, Euskal Herriko Unibertsitatea UPV/EHU
jezenarro001@ikasle.ehu.eus

Laburpena

Infusio mota ezberdinek duten ahalmen antioxidatzailea aztertzeko metodo berri bat garatu da Folin-Ciocalteu erreakzioa oinarritzat hartuz, honela determinazio kolorimetriko bat egin ahal izateko irudi digitalen analisi bidez. Horrez gain, metodo berri honen optimizazioa, baldintzen azterketa eta automatizazioa garatu dira, helburu honetarako ez ezik argi ikuskorra absorbatzen duen edozein konposaturen irudi digitalen analisi bidezko determinaziorako baliagarria den inguruko argiaren zuzenketa eta *on-line* programa bat garatuz: MADDI.

Hitz gakoak: antioxidatzaile, Folin-Ciocalteu, irudi digital, kolorimetria, argi

Abstract

A new method has been developed for the determination of the antioxidant capacity of infusions based on the Folin-Ciocalteu method, so a colorimetric determination can be carried out by analysis of digital images. Furthermore, the analysis conditions of this method have been examined, optimized and not just for this method but for the determination of any visible light absorbing compound a light correction and an on-line program for the automation of the picture processing have been developed: MADDI.

Keywords: antioxidant, Folin-Ciocalteu, digital image, colorimetry, light

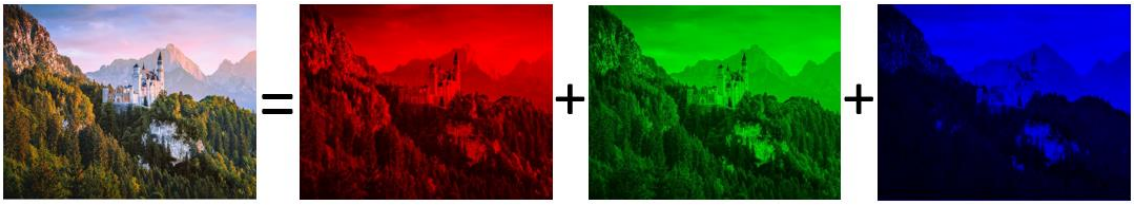
1. Sarrera eta motibazioa

Disoluzio baten ahalmen antioxidatzailea espezie oxidatzaileak desaktibatzeko duen gaitasuna da. Espezie oxidatzaile hauek kaltegarriak dira giza organismoarentzat, zahartze zelularra eta erlazionatutako hainbat gaixotasun sortzen baitituzte: gaixotasun kardiobaskularrak, minbiziak, osteoporosia… eta gaixotasun neurodegeneratiboetan eta diabetes mellitusean eragina izan dezakeela uste da (Scalbert et al., 2005).

Elikagai baten ahalmen antioxidatzailea hain garrantzitsua izaki, gure eguneroko dietaren bidez lortzen dugun ahalmen antioxidatzailea ezagutzea oso baliagarria izan daiteke. Honetarako erabiltzen den erreferentziazko metodoa Folin-Ciocalteu erreakzioan eta espektrofotometroan oinarritutakoa da (Folin eta Ciocalteu, 1927): erreakzio honetan wolframio eta molibdeno gatzak antioxidatzaileekin erreakzionarazten dira ingurune basikoan, lehen hauek erreduzituz molibdeno urdina lortzeko, disoluzioari kolore urdin iluna emanez, eta honek absorbatzen duen argia espezie antioxidatzaileen kontzentrazioarekiko proportzionala izanik. Ondoren argiaren absorbantzia hori espektrofotometro batekin neurtzen da 765 nm-ko uhin-luzeran. Infusioetan espezie antioxidatzaile ezberdinak daudenez, azido galikoaren (ohiko antioxidatzaile ezagun eta eskuragarria) kontzentrazio baliokideetan adierazten da disoluzio hauen ahalmen antioxidatzailea.

Lan honen helburua, ordea, metodo berri, fidagarri, azkar, merke eta berdeagoa garatzea da, Folin-Ciocalteu erreakzioan oinarrituz. Horretarako irudi digitalen analisia erabili da, irudi bat gorputzek absorbatzen duten argi ikuskorra neurtzeko beste modu bat besterik ez baita. Argazki digital batek irudia pixeletan banatzen du, sare bat balitz bezala, eta pixel bakoitzeko kolorea hiru kolore primarioren konbinazio gisa osatzen du, 1. irudian ikus daitekeen bezala: kolore hauei kanalak deritze (Red, Green eta Blue kanalak; R, G eta B deituak). Disoluzio bati argazkia atera ondoren, disoluzio hori ageri den pixelak iruditik banatu eta kanal hauetan dituzten balioak erabiliz absorbantziaren baliokide bat lortu daiteke, kolorimetria tradizionalean bezala kontzentrazioarekin erlazionatu daitekeena hau determinatzeko.

1. irudia. Argazki baten deskonposaketa R, G eta B kanaletan, hurrenez hurren.



2. Arloko egoera eta ikerketaren helburuak

Irudi digitalen analisi bidezko teknika analitikoak bogan daude eta hainbat ikerkuntza lerrok hartu dute hau oinarritzat, hala nola mikroplaketan disoluzioak prestatuz eta eskaner batekin irudia lortuz (Vidal et al., 2018), eta berau Folin-Ciocalteu erreakzioan oinarrituz garagardoen ahalmen antioxidatzailea neurtzeko (Martins Ledesma et al., 2019). Bestalde, beste ikerketa batzuetan telefono mugikorreko argazkiak eta argi baldintza kontrolatuak (kutxa itxia, LED argiak…) erabiliz egin dira determinazioak (Silva eta Rocha, 2020).

Baina lan honen helburua irudi digitalen bidezko analisiaren bidez infusio ezberdinen ahalmen antioxidatzailea neurtzea da, telefono mugikorra bakarrik erabiliz, beste inolako aparailu edo muntaiaren beharrik gabe. Horretarako inguruko argi naturalaren zuzenketa matematiko bat garatu nahi da, irudien prozesamenduan aplikatuz inguruko argiaren bariaziotik datorren errorea minimizatzeko.

3. Ikerketaren muina

3.1. Erreakzio kolorimetrikoa

Antioxidatzaileak diren espezieen kontzentrazioa determinatu nahi bada kolorimetriaz, beharrezkoa da hauek argi ikuskorra absorbatzea eta absortzioa intentsua eta kontzentrazioarekiko proportzionala izatea. Hau ez denez horrela beharrezkoa da ahalmen antioxidatzailearekiko proportzionala den koloredun espezie bat sortzea, eta hori egitea ahalbidetzen duena Folin-Ciocalteu erreakzioa da.

Folin-Ciocalteu erreakzioa mikroplaka batean burutu da. Mikroplaka hauek hainbat abantaila dituzte: bolumen oso txikiekin egin daiteke lan (400 µL-koak dira putzuak), argazkia ateratzeko egokiak dira, mugikorrak, egonkorrak eta 96 putzu dituztenez kalibratua zein hainbat lagin, bakoitzaren behar adina erreplikarekin, plaka berean prestatu eta determinatu daitezke.

Erreakzio honek lau pauso ditu: lehenik espezie antioxidatzaileak dituen lagina gehitzen da putzura. Bigarren, Folin-Ciocalteu erreaktibo komertziala gehitzen zaio (20 µL, soberan) eta ondo nahasteko 5 bat minutu eman ondoren sodio karbonato disoluzio bat (64 µL, 100 mg/L) gehitzen da ingurunea basikotzeko. Azkenik, karbonatoak deskonposatzean sortzen dituen karbono dioxido burbuilek ihes egin ondoren, edo hala ez bada, kendu ondoren, ur bidestilatuarekin guztiz betetzen da putzua gainazala laua izan dadin (kapilaritateagatik ahurra edo ganbila bada argazkia ateratzerakoan distirak sortu eta arazoak eman baititzake). Erreakzioa ez denez berehalakoa, posible den kolore gehiena lor dadin bi ordu itxaroten da argazkia atera aurretik.

3.2. Datuen neurketa eta prozesamendua

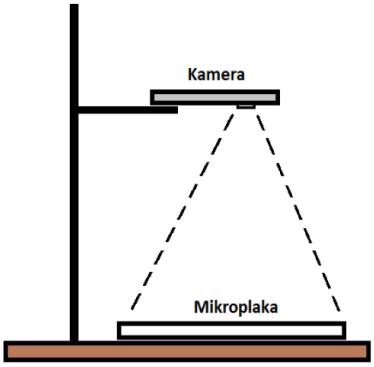
Argazkia ateratzeko 2. irudian ikusten den muntaia erabili da, mikroplaka hondo zuri baten gainean ipiniz eta mugikorra metro erdi inguruko altueran, mikroplakarekiko paralelo. Honela 3. irudikoa bezalako argazkiak lortzen dira, perspektibarik eta distirarik gabeak, prozesamendua erraztuko dutenak.

Irudi digitala lortu ondoren hau prozesatu beharra dago, erabili den putzu bakoitzeko disoluzio bakoitzaren batezbesteko R, G edo B balioak lortu ahal izateko. Horretarako garatu da MADDI on-line[1] (Microplate Analysis by Decomposition of Digital Images) programa, aurreko lan batean (Ezenarro, 2020) garatutako mahaigaineko MADDItik abiatuz: programa honetan irudia kargatu ondoren, bertan mikroplaka kokatzen da, marko batekin lerratuz, ondoren, programak

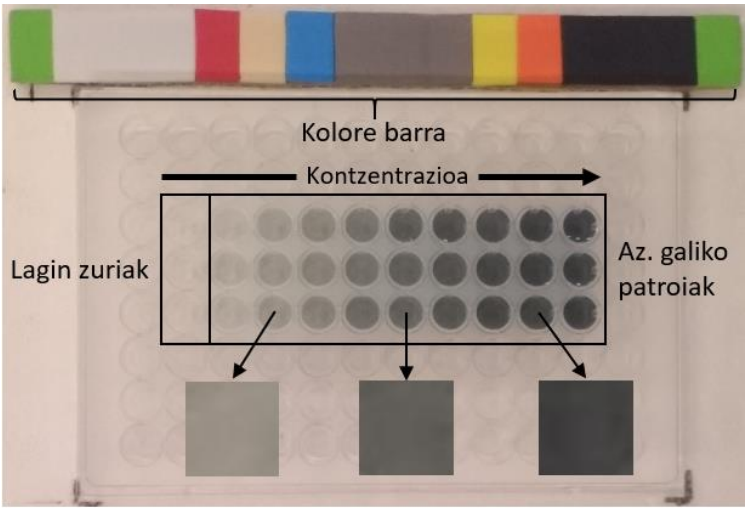
[1] maddi-project.github.io

automatikoki putzu bakoitzetik nahi hainako pixel kopurua (kasu honetan 10x10eko lauki bat, 100 pixel) hartu eta hauen batezbestekoak kalkulatzen ditu 3 kanalentzat.

2. irudia. Argazkiak ateratzeko erabilitako muntaia.



3. irudia. Argazki baten adibidea.



Balio hauek ez dira, ordea, kontzentrazioarekiko zuzenki proportzionalak, beraz, absorbantziarekiko baliokidea eta kontzentrazioarekiko zuzenki proportzionala den balioa kalkulatu beharra dago, (1) ekuazioa erabiliz (Abderrahim et al., 2016):

$$A_K = \log(I_K/I_{K0}) \quad (1)$$

K: R, G edo B; A_K: Laginaren absorbantzia K kanalean; I_K: Laginaren pixelen batezbesteko balioa K kanalean; I_{K0}: Lagin zuriaren pixelen batezbesteko balioa K kanalean.

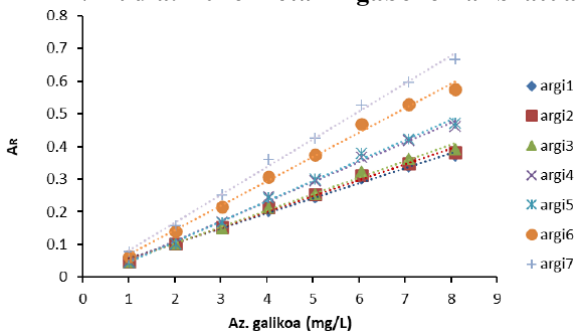
Argazkiak ez direnez argi baldintza kontrolatuetan ateratzen, mikroplaka beraren bi argazkik absorbantzia balio ezberdinak izan ditzakete, nahiz eta lagin zuriarekiko normalizatzeak errorea txikitzen duen. Hau ez da arazoa laginak eta kalibratua argazki berean daudenean, baina argazki ezberdinetako disoluzioak alderatu nahi direnean errorea handia izan daiteke. Horregatik ondorengo zuzenketa proposatu da: mikroplakaren ondoan kolore barra bat jarri da (ikusi 2. irudia), beti kolore berdinak izango dituena, eta argazkitik honen kolore bakoitzaren R, G eta B balioak atera dira lehen azaldu bezala MADDIrekin. Azkenik balio guzti hauen batezbestekoa kalkulatu da, Z balioa deitu zaiona, eta argazki bakoitzari bereizgarria zaiona, argi baldintzen indikatzailea. Balio honekin hainbat zuzenketa probatu ondoren egokiena (2) ekuaziokoa dela ondorioztatu da (Ezenarro, 2020):

$$A_{Kzuz} = A_K \cdot \sqrt{Z} \quad (2)$$

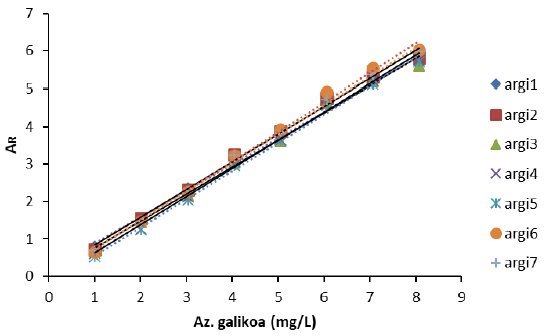
A_K: Laginaren absorbantzia K kanalean; A_{Kzuz}: Laginaren absorbantzia zuzendua K kanalean; Z: Argiaren indikatzailea erabili den argazkian

Zuzenketa hau probatzeko 2. irudikoa bezalako mikroplaka bat prestatu da, azido galiko patroiez osatutako kalibratu bat duena, eta argi baldintza ezberdinetan atera zaizkio argazkiak. Ondoren, argazki hauek prozesatu eta absorbantzia balioak zuzendu gabe (4. irudia) eta (2) ekuazioko zuzenketarekin (5. irudia) irudikatu dira.

4. irudia. Zuzenketarik gabeko kalibratuak.



5. irudia. Zuzendutako kalibratuak.

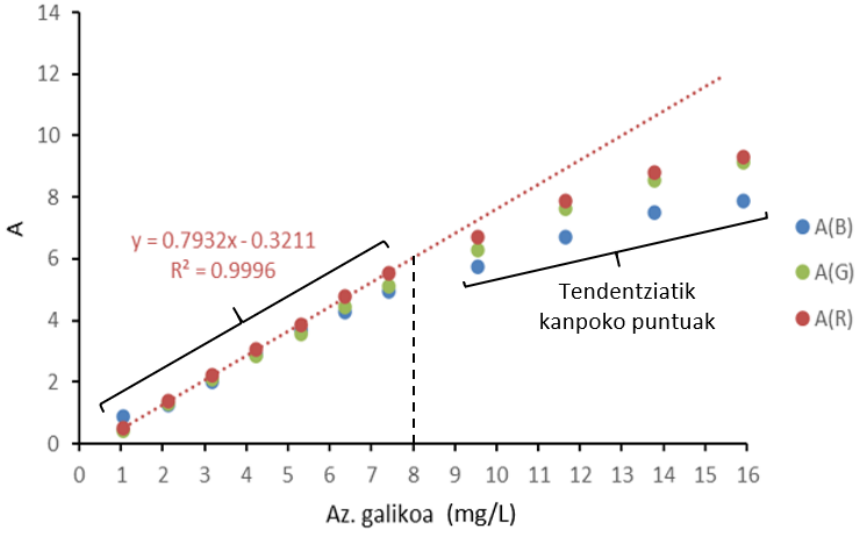


4. eta 5. irudietan ikus daitekeenez zuzenketa honek maldak berdintzen ditu, kasu honetan zuzenen malden arteko RSDa (Relative Standard Deviation, balio baten neurketa ezberdinen arteko aldakortasuna hauen batezbestekoarekiko normalizatuta) % 24 izatetik % 4 izatera igaro da, eta horren ondorioz neurketen estimatutako errorea % 25etik % 5era jaitsi da. Baina zuzenketa honek funtzionatu dezan beharrezkoa da mugikorraren kameraren argiaren zuzenketa automatikoa desaktibatzea eta argazkiak eskuzko konfigurazioarekin ateratzea, guztiak berdin.

3.3. Metodoaren balioztatzea

Behin erabiliko den prozedura eta datuen prozesamendua zehaztuta, metodoa balioztatu beharra dago egingo diren analisien emaitzak fidagarriak direla ziurtatzeko eta zein baldintzetan egin daitezkeen aztertzeko. Horretarako ondorengo parametroak aztertu dira azido galiko patroien kalibratutik (6. irudia) abiatuz: tarte lineala, detekzio eta kuantifikazio mugak, doitasuna eta zehaztasuna.

6. irudia. Azido galiko patroi disoluzioz osatutako kalibratua.



Lehenik erabiliko den kanala hautatu beharra dago, kolore ezberdineko disoluzioentzat ezberdina baita. 6. irudian ikus daitekeenez hiru kanaletan absorbantzia ona eta kontzentrazioarekiko proportzionala izan arren R kanalean apur bat handiagoa da, beraz, honekin egin da lan metodoaren sentikortasuna hobetze aldera.

Tarte lineala, seinalea eta kontzentrazioa zuzenki proportzionalak diren tartea, determinatzeko, zuzenaren R^2 erabili da irizpidetzat, 8 mg/L inguru arte 0,999-koa izanik, tarte lineala 1-8 mg/L azido galiko da. Hortik aurrerako puntuak joera linealetik kanpo daude. Infusioak matrize konplexuak direnez posible liteke disoluzioan dagoen beste substantziaren batek seinalean eragitea. Horregatik patroi gehikuntza erabiliz probak egin dira, ondorioztatuz matrize efektua ez dela adierazgarria.

Detekzio muga (LOD) eta kuantifikazio muga (LOQ) ziurtasun estatistiko adierazgarriarekin detekta daitekeen analito kontzentraziorik txikiena eta ziurtasun estatistiko adierazgarriarekin kuantifikatu daitekeen analito kontzentraziorik txikiena dira hurrenez hurren. Hauek kalkulatzeko

6 lagin zuri prestatu dira eta hauen absorbantziak neurtu, ondoren hauen batezbestekoa eta desbideratzetik muga hauek kalkulatuz: LOD: 0,10 mg/L az. galiko eta LOQ: 0,33 mg/L az. galiko. Muga hauek infusioek dituzten kontzentrazioak baino askoz ere baxuagoak direnez eta tarte linealaren hasierako muturra bakarrik hartzen dutenez egokiak dira lan honetarako.

Metodoaren doitasuna aztertzeko bi parametro neurtu dira: errepikakortasuna eta erreproduzigarritasuna. Ezaugarri hauek metodoaren sendotasunaren adierazgarri dira, hau da, baldintzak apur bat aldatuta ere emaitzak fidagarriak direla ziurtatu nahi da. Errepikakortasuna ikusteko momentu berean 6 mikroplaka prestatu dira, kontzentrazio ezberdinetako disoluzio berdinekin guztietan, eta hauek jada sortutako kalibratuarekin determinatu ondoren balioen batezbesteko RSDa kalkulatu da: % 2,6koa. Erreproduzigarritasuna ikusteko, berriz, aurrekoak bezalako 2 mikroplaka prestatu dira egunean, 3 egun ezberdinetan, eta disoluzio hauek ere determinatuta RSDa kalkulatu da: % 2,9koa. 1 mg/L-ren ordenean dauden kontzentrazioentzat onargarritzat hartzen diren errepikakortasuna eta erreproduzigarritasunaren RSDak % 11 eta % 16rainokoak dira hurrenez hurren (AOAC, 2016). Beraz, kontuan hartu beharra dagoen arren ez dela egin parametro hauen behar bezalako ikerketa sakona (baliabide eta denbora faltagatik) metodoa sendoa dela esan daiteke.

3.4. Lagin errealen analisia

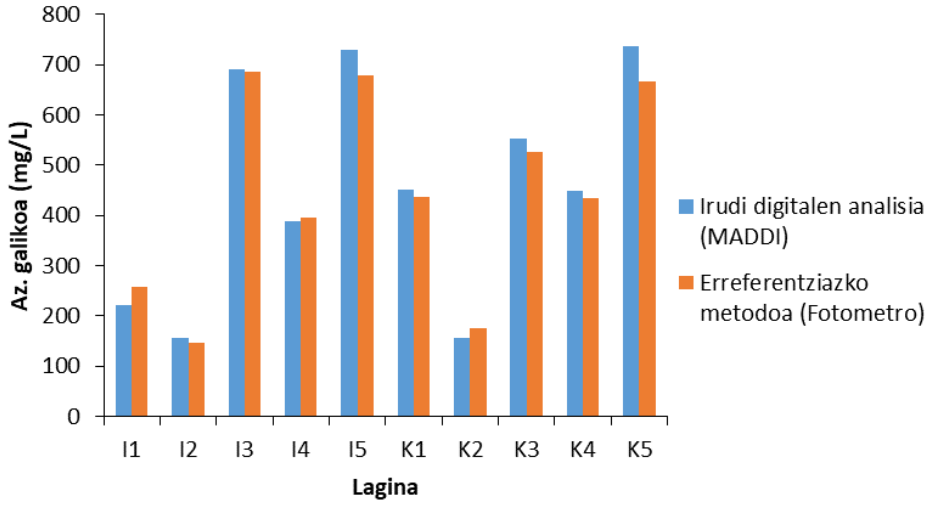
Zehaztasuna lortutako emaitzen eta benetako balioen arteko antzekotasuna da, hau aztertzeko lagin errealak erabili dira, 1. taulan agertzen diren laginak hain zuzen. Bost lagin solido komertzial (I1-I5), infusio poltsatxoak, eta bost lagin likido komertzial (K1-K5), te infusioetan oinarritutako edari freskagarriak. Lagin solidoak determinatu ahal izateko urarekin erauzi dira, eta erauzketaren aldagaiak (tenperatura, denbora, bolumena…) optimizatzeko esperimentuen diseinua erabili da.

Estatistikaren adar honek esperimentu gutxiago baina adierazgarriagoak eginez prozesuan eragina duten aldagaiek duten jokaera ondorioztatzea ahalbidetzen du. Honela aldagai bat aztertzeko besteak finkatu beharrean guztiak batera aldatzen dira, hauen maila altu eta baxuen konbinazio adierazgarri guztiekin errepikatuz esperimentua, ondoren datu hauetatik interesekoa den propietatearen eta aldagaien arteko erlazioa ezagutzeko.

Hau eginez ondorioztatu da ahalmen antioxidatzailea erauzketarako erabilitako tenperatura eta denborarekiko zuzenki proportzionala dela, beraz, uraren lurruntze tenperaturak eta denborak mugatuta, normalean etxean infusioak prestatzeko erabiltzen diren antzeko baldintzekin egin dira erauzketak: 200 mL ur bidestilatutan, 100 ºC-tan eta 5 minutuz.

Lagin hauei tarte linealaren erdialdean sartzeko egokiak diren diluzioak aplikatu ondoren bi modutara determinatu zaie ahalmen antioxidatzailea: balioztatu nahi den irudi digitalen analisi bidez eta erreferentziazko metodoa den espektrofotometro ultramore-ikuskorra erabiliz, biak Folin-Ciocalteu erreakzioan oinarrituak. Honela metodo berriarekin lortutako emaitzak eta emaitza ontzat hartu daitezkeen erreferentziazko metodoarekin lortutakoak alderatu ahal izateko.

7. irudia. Bi metodorekin egindako laginen analisien emaitzak.



7. irudian ikus daitekeenez bi metodo hauek erabiliz lortutako emaitzak berdintsuak dira. Ezberdintasun hau kuantifikatzeko errore erlatiboa kalkulatu da, guztien batezbestekoa % 6,5ekoa izanik.

Analisi hauen emaitzak 1. taulan ageri dira, lagin solidoenak erabili den lagin solidoaren masarekiko normalizatu dira. Ikus daitekeenez ahalmen antioxidatzailea asko aldatu daiteke infusio motaren arabera.

Te lagin solidoak eta likidoak elkarren artean alderatuz gero ahalmen antioxidatzailearen arabera ordenatu daitezke: K5 > K3 > K1 > K4 > K2 eta I5 > I3 > I4. Eta 1. taularekin alderatuz halako erlazio bat antzeman daiteke:

Te zurian oinarritutako infusioa da ahalmen antioxidatzaile handiena duena, ondoren, te berdean oinarritutakoak, eta azkenik, te gorria eta te beltza. Kontuan hartuz gero te mota guztiak landare berdinetik eratorriak direla eta ezberdintasun bakarra hauek prozesatzeko modua dela, ondorioztatu daiteke prozesamendu honek infusioen ahalmen antioxidatzailean eragina duela. Te zuria lortzeko hosto gazteak bildu eta denbora gutxira txigortzen dira, oxidazioa mugatuz (Zhao et al, 2019). Te berdea lortzeko hosto helduak bildu eta berehala txigortu edo lurrun bainua aplikatzen zaie, oxidazio gutxi jasaten dutelarik (Graham, 1992). Te gorria lortzeko, ordea, hosto helduak bildu ondoren lehortu eta zuritu egiten dira eta hartzitzen utzi, kolore gorrixka ezaugarria lortuz. Azkenik, te beltza lortzeko hosto helduak bildu ondoren lehortu eta zuritu egiten dira te gorria bezala, baina ondoren mazerazioa izeneko prozesu bat aplikatzen zaie, egitura zelularra hautsiz, entzimak askatuz eta hostoaren oxidazio totala emanez (Stodt, 2014).

1. taula. Irudi digital bidez egindako lagin errealen analisien emaitzak.

Lagina	Infusio mota	Az. galiko (mg/L)	Az. galiko (mg/g)
I1	Mugurdia	220 ± 14	31 ± 2
I2	Frutak	155 ± 18	21 ± 2
I3	Te beltza	693 ± 62	79 ± 7
I4	Te gorria	389 ± 20	48 ± 3
I5	Te berdea	730 ± 77	96 ± 10
K1	Te berdea	452 ± 46	
K2	Te beltza	176 ± 15	
K3	Te berdea	555 ± 42	
K4	Te berdea	449 ± 41	
K5	Te zuria	740 ± 77	

Beraz, esan daiteke tearen prozesamenduak eta bertan jasaten duen oxidazioak eragin zuzena duela ondoren hauen infusioek izango duten ahalmen oxidatzailean, prozesuan zenbat eta gehiago oxidatu orduan eta antioxidatzaile eduki txikiagoa izango baitute infusioak prestatzeko erabiltzen diren hostoek.

4. Ondorioak

Metodo berri hau aztertu ondoren esan daiteke oso erabilgarria dela testuinguru jakin batzuetan. Irudi digitalen analisi bidezko kolorimetria ez da inoiz espektrofotometro bidezko kolorimetria bezain zehatza eta fidagarria izango, noski, ohiko metodoekin lortu daitezkeen emaitzek ziurgabetasun txikiagoa baitute, baldintzak askoz kontrolatuagoak direlako.

Baina metodo honek beste abantaila batzuekin osatzen du erabilgarritasuna: merkea da, edonork du mugikor edo kamera digital bat eskura, inbertsio handirik egin gabe. Gainera eramangarria da eta ez du sekulako muntaiarik behar. Bestalde, mikroplakak erabiltzeak 96 disoluzio batera analizatzea ahalbidetzen du, analisi eta prestaketa denborak asko murriztuz. Horrez gain, bolumen oso txikiekin egin daiteke lan, laginaren eskuragarritasuna txikia bada oso baliagarria eta erabili beharreko produktuak arriskutsuak edo kaltegarriak badira hare gehiago. Azkenik, inguruko argiarekiko absorbantziaren zuzenketak argazki bakoitzean laginak eta patroiak eduki beharra baztertzen du, kalibratua behin bakarrik prestatuta lan egitea ahalbidetuz. Halere, zuzenketa hau aplikatzerakoan ikusi da erroreak egon daitezkeela argazki ezberdinak

erabiltzerakoan ez bada modu egokian egiten, espektrofotometro batekin ez bezala analista trebatu eta esperientziaduna beharrezkoa da emaitzak fidagarriak izango badira.

5. Etorkizunerako planteatzen den norabidea

Lan honetan ikusi denez ez da beharrezkoa argi baldintzak kontrolpean izatea, posible da datuen tratamendu egoki batekin errore hori minimizatzea, baina lan honetan proposatu den zuzenketa ziurrenik ez da optimoa, aurkitu den egokiena baizik, aukera eta metodo gehiago aztertu beharra dago. Hala nola, datu hauen prozesamendua automatizatzeko garatu den programa, MADDI, zabaltzen eta hobetzen jarraitu daiteke, erabilerrazagoa eta azkarragoa izan dadin, kalibratuak eta azterketa estatistikoak egin ditzan, etab. Gainera, absorbantziaren zuzenketa oso on bat lortuko balitz posible litzateke erreakzio kolorimetriko ezberdinentzat kalibratuen datu base bat sortzea, hala nola aplikazio batean, *screening* probak egiteko bada ere.

6. Erreferentziak

Abderrahim, M., Arribas S. M., Condezo-Hoyos, L. (2016): A novel high-throughput image based rapid Folin-Ciocalteau assay for assessment of reducing capacity in foods, *Talanta*, 152, 82-89.

AOAC International. (2016): Official Methods of Analysis. Appendix F: Guidelines for Standard Method Performance Requirements.

Ezenarro J. (2020), Polifenol eduki totalaren determinazioa irudi digitalen analisi bidez eta hauen tratamendurako softwarearen garapena. Kimikako Gradu Amaierako Lana, Kimika Fakultatea, EHU.

Folin, O. eta Ciocalteu. V. (1927), On tyrosine and tryptophane determinations in proteins, *Journal of Biological Chemistry*, 73, 627-650.

Graham, H. N. (1992), Green tea composition, consumption, and polyphenol chemistry, *Preventive Medicine*, 21 (3), 334-350.

Martins Ledesma, C., Mascarenhas Krepsky, L., Marcel Borges, E. (2019), Using a flatbed scanner and automated digital image analysis to determine the total phenolic content in beer, *Journal of Chemical Education*, 96, 10, 2315-2321.

Stodt, U. W., Blauth, N., Niemann, S., Stark, J., Pawar, V., Jayaraman S., Koek. J., Engelhardt. U. H. (2014): Investigation of processes in black tea manufacture through model fermentation (oxidation) experiments, *Journal of agricultural and food chemistry*, 62 (31), 7854-7861.

Scalbert, A., Manach, C., Morand, C., Rémésy C., Jiménez, L. (2005), Dietary polyphenols and the prevention of diseases, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 45, 287-306.

Silva, A. F. S. eta Rocha, F. R.P. (2020), A novel approach to detect milk adulteration based on the determination of protein content by smartphone-based digital image colorimetry, *Food Control*, 115, 107299.

Vidal, M., Garcia-Arrona, R., Bordagaray, A., Ostra M., Albizu G. (2018), Simultaneous determination of color additives tartrazine and allura red in food products by digital image analysis, *Talanta*, 158, 58-64.

Zhao, C. N., Tang, G. Y., Cao, S. Y., Xu, X. Y., Gan, R.Y., Liu, Q., Mao, Q. Q., Shang, A., Li, H. B. (2019), Phenolic profiles and antioxidant activities of 30 tea infusions from green, black, Oolong, white, yellow and dark teas, *Antioxidants*, 8, 215.

7. Eskerrak eta oharrak

Artikulu hau Euskal Herriko Unibertsitateak (GIU 19/13 proiektuak) emandako diru-laguntzei esker eraman da aurrera.

Lan hau Gradu Amaierako Lan baten memoriatik eratorri da (Ezenarro, 2020).

MADDI *on-line* programa erabili nahi izanez gero jarri artikulu honen egilearekin kontaktuan.

Behi-esnearen gantz edukiaren determinazioa NIR espektroskopia eta kimiometria erabiliz

Ezenarro, J.[1]; García, I.[2] eta Ostra, M.[1]

[1]*Kimika Aplikatua, Kimika Fakultatea, Euskal Herriko Unibertsitatea UPV/EHU*
[2]*AOTECH*
jezenarro001@ikasle.ehu.eus

Laburpena

Esnearen gantz edukia ezagutzea beharrezkoa da gaur egungo elikagaien industrian, eta metodo tradizionalak erabili beharrean NIR espektroskopia erabiltzeak bertako eta zuzeneko analisiak egitea ahalbidetzen du. Hau honela, esnearen gantz edukia determinatzeko metodo alternatibo honen azterketa egin da, espektrometro berri baten garapenak beharrezkoak dituen kalibratuak sortuz aldagai anitzeko analisia (kimiometria) eta NIR espektroen prozesaketaa baliatuz esne motaren araberako sailkapen ereduak eta gantz edukia aurresateko ereduak sortzeko modu ezberdinak aztertuz.

Hitz gakoak: esne, gantz, NIR, espektroskopia, kimiometria

Abstract

Knowing the fat content of the milk is compulsory in the modern industry, and using NIR spectroscopy instead of the traditional methods allows for the analysis to be carried out in the place and immediately. This being a need, this alternative method for the milk fat content determination has been researched, building the calibration models that the development of a new spectrometer needs, using multivariable analysis (chemometrics) and different processings of NIR spectra to examine different ways of creating models for classificating milks by type and predicting its fat content.

Keywords: milk, dairy, fat, NIR, spectroscopy, chemometrics

1. Sarrera eta motibazioa

Behi-esnea gizartearen gehiengoaren dietan dagoen elikagaia da, jatorrizko egoeran edo deribatu moduan (jogurta, gazta, etab.), beraz, funtsezkoa da honen ezaugarriak eta kalitatea ezagutzea. Honetarako gehien erabiltzen diren metodoak laborategiko analisi tradizionalak dira: gantzarentzat Mojonnier (AOAC, 2007) edo Gerber (AOAC, 2007) metodoak. Metodo hauek prestaketa eta analisi prozesu luzeak dituzte, ordea, eta lagina hartzen denetik emaitzak izan arte orduak edo egunak igaro daitezke.

Teknika espektroskopikoek, tradizionalek ez bezala, berehalako emaitzak eskaini ditzakete kasu honetan bezala laginaren prestakuntzarik behar ez bada, hau da, laginak bildu, tratatu, seinale bat neurtu eta prozesatu beharrean, zuzenean emaitza bat lor daiteke. Horregatik interesgarria da hauen garapena, batez ere industriarentzat. Kimika berdearen 11. printzipioa (Anastas eta Warner, 1998) jarraituz, produkzioaren ezaugarrien momentuko ezagutzak beharrezkoa bada momentuko aldakuntzak egitea ahalbidetzen du, galerak eta ingurugiroan duen eragina murriztuz.

Esnea matrize oso konplexuko lagina izaki, infragorri hurbilean (NIR) erreflektatzen duen argia sustantzia kopuru oso handi batek eragindakoa da, beraz, ez da nahikoa uhin-luzera batean dagoen aldakortasuna aztertzea analitoen kontzentrazioarekin zuzenean erlazionatzeko. Beharrezkoa da esnearen espektro osoa aztertzea analito edukia, hau da, gantz edukia aurresango duen eredu bat eraiki nahi bada, edo esne motaren arabera sailkatu nahi bada. Hau egitea ahalbidetzen duen tresna da kimiometria, eta honek lantzen dituen arloen artean aldagai anitzeko analisia da lan honetan erabiliko dena. Estatistikaren adar honek aldagai (uhin-luzera) bakoitzaren balioetan dagoen aldakuntza eta azaldu nahi den propietatearen aldakuntza, kasu honetan gantz edukiaren aldakuntza, elkarren artean erlazionatzen ditu enpirikoki. Pisu gehiago duten aldagaiak aurkitu eta hauei koefiziente handiago bat esleitzen die erregresio bat sortzerako garaian, honela begi bistaz ikusten ez den eta korrelazio sinpleak erabiliz aurkitu ezin den informazioa erabilgarri bihurtzen da.

NIR espektroak lortzeko AOTECH enpresak garatutako espektrometroa erabili da: enpresa hau EHUko Fotonika Aplikatuko Taldeko *spin-off* bat da, helburutzat industriarako baliabide fotonikoak garatzea duena. Elikagaien industriarako NIR espektroskopiarentzat AONIR izeneko plataforma sortuz merkatuko ekipoen prezioa asko murriztea lortu da, horrez gain informazioaren prozesaketa guztia egiten duten eta intereseko datuak (analisien emaitzak) bakarrik bidaltzen dituzten aparailuak garatuz. Gainera, espektrometro hau laginik hartu beharrik gabe lan egiteko garatu da, hau da, analizatu nahi den produktuarekin, kasu honetan esnearekin, denbora guztian kontaktuan egoteko, espektroak nahi denean bilduz. Sistema esne fluxua daraman hodira zuzenean konektatu daiteke, nahi adina neurketa eginez eta zuzeneko emaitzak lortuz inolako lanik egin gabe.

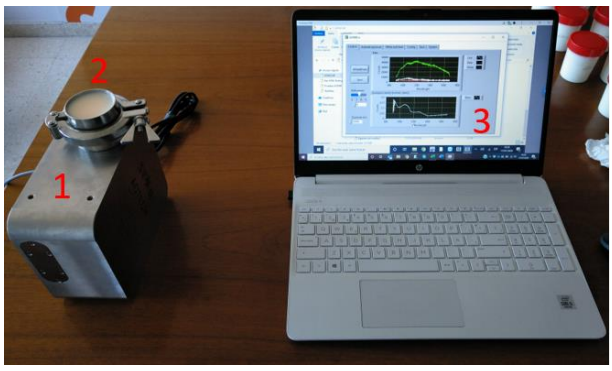
2. Arloko egoera eta ikerketaren helburuak

NIR espektroskopia industrian gero eta gehiago erabiltzen den teknika analitikoa da, batez ere elikagaien industrian. Hainbat lan eta ikerketa egin dira metodo honekin behi-esnearen gantz edukia determinatzeko: hala nola Petri plaketan (dos Santos Pereira et al., 2020) edo hauspeakin ontzietan zunda baten bidez (Růžičková eta Šustová, 2018). Metodo hauek laginen bilketa, garraioa eta neurketa beharrezkoa dute oraindik, baita espektroen ondorengo prozesaketa ere. Bestalde, esan bezala, lan honetan erabili den AOTECH espektrometroaren helburua zuzeneko analisiak egitea da, hau da, sistema esnea produzitzen, garraiatzen edo prozesatzen den gunean bertan kokatzeko garatu da, zuzenean hodira edo tankera konektatu daiteke. Honek espektroak nahi denean neurtzea ahalbidetzen du, eta erregresio ereduak sistemak barneratuta dituenez hauen prozesaketa ere berehalakoa da, neurtzen ari den produktuaren zuzeneko monitorizazioa egitea ahalbidetuz, beste inolako prozesaketa edo tratamendurik egin gabe. Gainera, IoT (Internet of Things) sistema baliatuz emaitza hauek nahi den lekuan jaso eta bildu daitezke, urruneko jarraipena ere posible eginez. Horregatik, ikerketa honen helburua neurtuko diren espektro hauek erabilgarria den datu bihurtuko dituen ereduak garatzea da, hala nola zein esne mota den edo zein den honen gantz edukia.

3. Ikerketaren muina

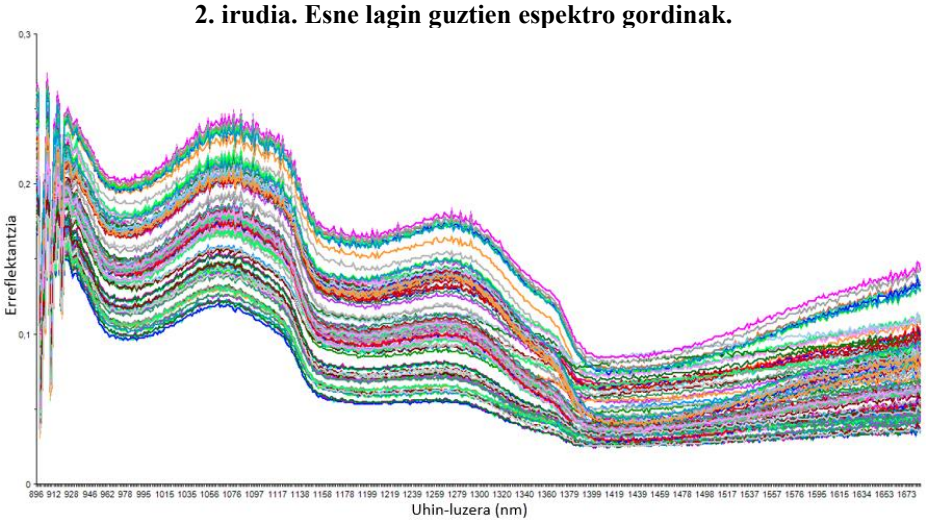
Ikerketa honen helburua hodietan zehar doan esnearen kalitatearen kontrola egiteko gai den instrumentu bat garatzea da. Horregatik espektroak lortzeko esnea espektrometroaren leihoaren kontra jarri da, esnea garraiatzen duen hodira zuzenean konektatzea simulatuz, 1. irudian ikus daitekeen bezala. Espektrometro hau ordenagailu batetara konektatuta dago, espektroak berehala eskuratuz, eta behin ereduak sortutakoan baita esne mota eta gantz edukiaren datua ere.

1. irudia. 1: NIR espektrometroa; 2: Leihoa, esnearekin kontaktuan; 3: Espektrometroa kontrolatzeko ordenagailua eta softwarea.



Behin sistema hau funtzionala dela egiaztatuta laginketarekin ekin da: kalibratu bat osatzeko lehen pausoa adierazgarriak diren laginen karakterizazioa da, horretarako jatorri eta gantz eduki ezberdineko esne laginen NIR espektroak lortu dira, tenperatura ezberdinetan. Espektro hauek 2. irudian ikus daitekeen bezala 896 nm-tik 1685 nm-tarainoko tartea hartzen dute eta espektrometroaren ezaugarriek eraginda zaratatsuak dira eta gainezarri beharrean paraleloak dira, eta hau, ondoren azalduko den bezala, kontuan hartu behar da.

2. irudia. Esne lagin guztien espektro gordinak.



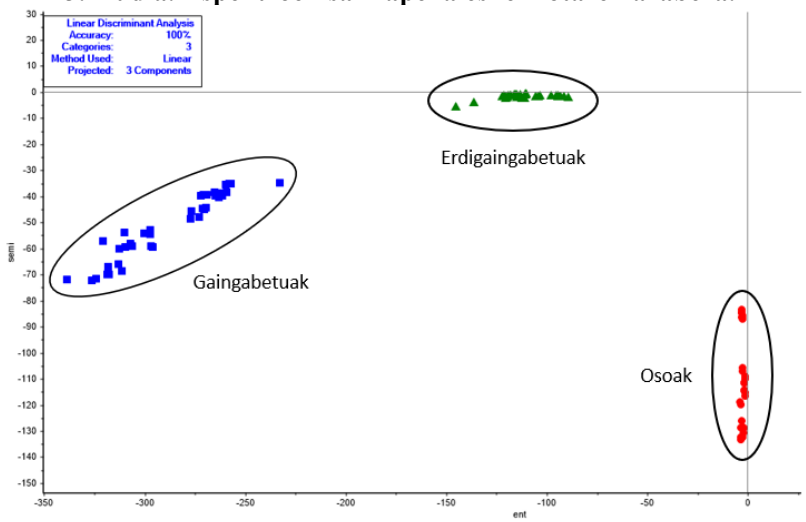
3.1. Sailkapen algoritmoa

Esan bezala izaera ezberdineko esne laginen espektroak neurtu dira, hala nola esne osoa (% 2-tik gorako gantz edukia), erdigaingabetua (% 0,5 eta 2 arteko gantz edukia) eta gaingabetua (% 0,5etik beherako gantz edukia), eta interesgarria denez NIR espektroskopiarekin hauek sailkatzea, hau egin dezakeen algoritmo bat sortu da.

Esne mota ezberdinen espektroak oso ezberdinak direnez zaratak ez du gehiegizko garrantzirik, beraz, espektro gordinak eta The Unscrambler© estatistika aurreratuko programaren LDA (Linear Discriminant Analysis) metodoa erabiliz espektro hauek esne mota bat edo bestean sailkatuko dituen algoritmo bat sortzea posible da. Honetarako kalibrazio laginak erabilitzen dira, hau da, espektroa zein esne mota ezaguna duten laginak. Algoritmo honek balio bat esleitzen dio banatu nahi diren taldeetako bakoitzari, ondoren, uhin-luzera bakoitzean dagoen aldakuntza balio hauekin erlazionatzen du, garrantzi gehien duten uhin-luzerei pisu handiagoa emanez. Azkenik, uhin-luzera bakoitzari koefiziente bat esleituz espektro bakoitzetik balio bat lortzen du, eta balio hori hasieran taldeei esleitutako zein balioetatik hurbilago dagoen ikusita talde horretan sailkatzen du.

3. irudian ikus daitekeenez LDA metodoak 3 talde oso banatutan sailkatzen ditu esne mota ezberdinen espektroak, horrek esan nahi duena da algoritmoa ona izango dela espektro berriak sailkatzen, ez baitu ziurra ez den tarterik. Are gehiago, programak aurresaten duen zehaztasuna %100ekoa da. Hau da, laginak ez direnez nahasten edo gainezartzen, argia izango da lagin bat talde batekoa edo bestekoa den espektroari eredu hau aplikatzerakoan.

3. irudia. Espektroen sailkapena esne motaren arabera.



Algoritmo hau baliozkotzeko kalibrazio eredutik kanpo utzi diren laginen espektroak aurresan dira algoritmo honekin, 1. taulan ikus daitezkeen emaitzak lortuz. Programak aurresan bezala, talde egokian sailkatutako laginen kopurua %100ekoa da.

1. taula. Sailkapenaren balidazioko emaitzak.

Lagina	Tenperatura (ºC)	Esne mota	Aurresana
661-P 1	19	Osoa	Osoa
661-P 2	19	Osoa	Osoa
663-P 1	19	Erdigaingabetua	Erdigaingabetua
663-P 2	19	Erdigaingabetua	Erdigaingabetua
665-P 1	19	Gaingabetua	Gaingabetua
665-P 2	19	Gaingabetua	Gaingabetua
661-P 1	24	Osoa	Osoa
661-P 2	24	Osoa	Osoa
663-P 1	24	Erdigaingabetua	Erdigaingabetua
663-P 2	24	Erdigaingabetua	Erdigaingabetua
665-P 1	24	Gaingabetua	Gaingabetua
665-P 2	24	Gaingabetua	Gaingabetua
661-P 1	30	Osoa	Osoa
661-P 2	30	Osoa	Osoa
663-P 1	30	Erdigaingabetua	Erdigaingabetua
663-P 2	30	Erdigaingabetua	Erdigaingabetua
665-P 1	30	Gaingabetua	Gaingabetua
665-P 2	30	Gaingabetua	Gaingabetua

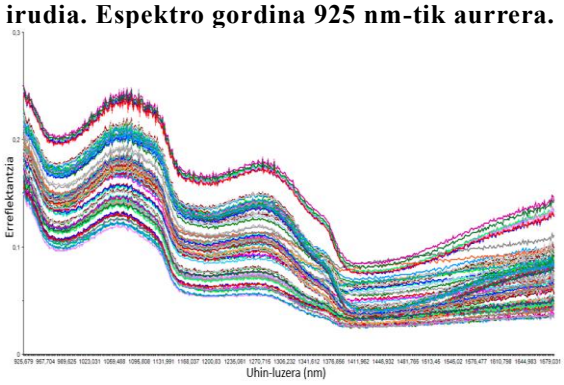
3.2. Gantz kontzentrazioaren determinazioa

Hurrengo pauso naturala esnearen gantz eduki zehatza aurresango duen algoritmo bat sortzea da. Kalibratu hobeak lortzeko asmoz espektroen prozesaketa ezberdinak probatu dira, hala nola informazio baliagarririk ez duten 925 nm arteko uhin-luzerak kentzea (4. irudia), zarata ezkutatzeko leuntze Gaussiarra (5. irudia), efektu biderkakorrak gutxitzeko lehen deribatua (6. irudia) edo efektu gehikor eta biderkakorrak gutxitzeko SNV (Standard Normal Variate) algoritmoa (7. irudia).

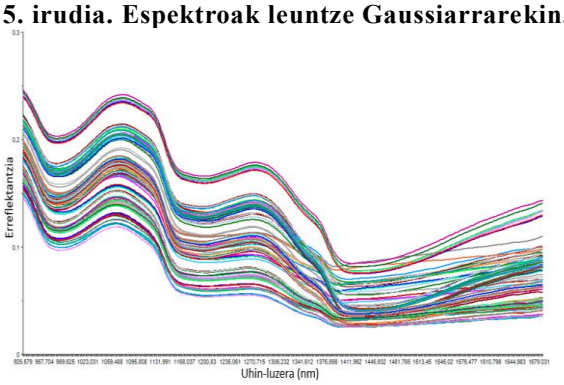
2. irudian ikus daitekeen bezala espektro gordinak zaratatsuak dira, hau da, esnearen propietateekin zerikusirik ez duen informazio ez-baliagarria gordetzen dute, beraz, aipatu diren prozesaketa hauek informazio hori kendu eta garrantzizkoa dena bakarrik uzteko ahaleginak dira. Zarata hau espektroak neurtzeko erabili den lekuak, ingurunea edo espektrometroaren lan-baldintzek (tenperatura, bibrazioak…) eragindakoa izan daiteke. 5. irudian ikus daitekeenez leuntzeak uhin-luzera bat eta hurrengoaren arteko jauzi txiki horiek ezabatzen ditu eta deribatuak eta SNVk efektu gehikorrak, hau da, espektro bat bestearekiko guztiz paraleloki baina gorago edo beherago egotea, gehienetan tenperaturak eragindako efektua. Honela 6 eta 7. irudietan ikus daiteke espektroak tarte handiago batean gainezartzen direla, benetan informazioa duten aldakuntzak agerian utziz.

Espektro hauei PLS (Partial Least Squares) algoritmoa aplikatu zaie esnearen gantz edukia aurresango duten ereduak sortzeko eta ikusi da eredu guztiak antzekoak direla, baina apur bat hobea dena eta aplikatzeko errazena, 4. Irudiko espektroak (gordinak baina 925 nm arteko uhin-luzerak kenduta) erabili eta erreflektantziaren balioak batezbestekoan zentratu eta autoeskalatuz egin den kalibratua da, uhin-luzera batzuetan besteetan baino balio eta aldakuntza handiagoak daudenez estatistikoki garrantzia berdina emateko.

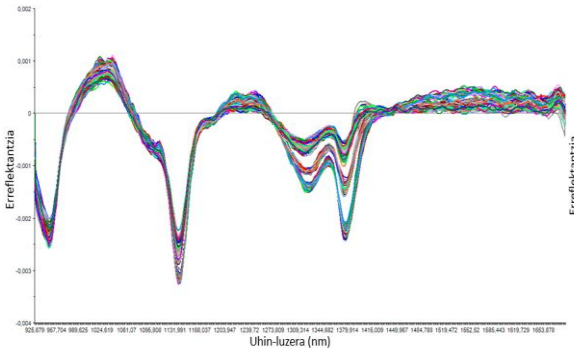
4. irudia. Espektro gordina 925 nm-tik aurrera.



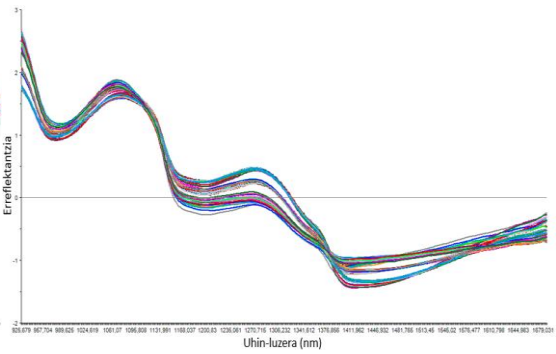
5. irudia. Espektroak leuntze Gaussiarrarekin.



6. irudia. Espektroak lehen deribatuarekin.



7. irudia. Espektroak SNVrekin.

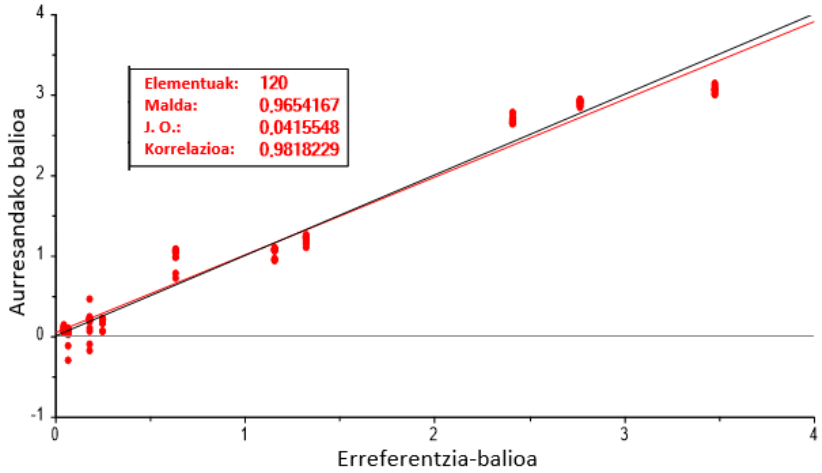


PLS algoritmoak LDA algoritmoaren antzeko funtzionamendua du, baina kasu honetan ez dago talderik ezta baliorik esleitu beharrik hauei ere, zuzenean uhin-luzera bakoitzean dagoen aldakuntza gantz edukian dagoen aldakuntzarekin erlazionatzen du, uhin-luzera bakoitzari koefiziente bat esleituz, ondoren espektroaren balioekin biderkatuz gantz edukia aurresango duena. Aldagai murrizketan oinarrituz egiten du hau: funtsean, aldagai kopuru handi batetik abiatuz (kasu honetan NIR espektroaren uhin luzerak) aldagai berri batzuk sortzen ditu (aldagai sorrak), elkarren artean independenteak direnak eta laginen gantz kontzentrazioa azaltzeko helburuarekin sortuak.

Eredu honek 491 aldagai, 491 uhin-luzera, 3 faktoretara edo aldagai sorretara murrizten ditu, hau da, esnearen gantz edukia hiru aldagairen funtzio gisa adierazten du (aldakuntzaren % 96 azalduz), aldi berean aldagai hauek 491 uhin-luzeren funtzio izanik.

Kalibratuaren balioztatze gurutzatua egiterakoan, hau da, eredua sortzeko erabili diren laginak kalibratutik banan-banan atera eta gelditu direnekin sortutako kalibratuarekin honen gantz edukia aurresaterakoan 8. irudia lortu da, erreferentziazko balioekiko irudikatuz. Bertan ikus daitekeenez idealki $y = 1 \cdot x + 0$ izan beharko lukeen ekuazioa $y = 0{,}97 \cdot x + 0{,}04$ da, kalibratu ona denaren adierazgarri.

8. irudia. Ereduaren aurresandako balioak erreferentzia-balioen aurrean.



Benetan kalibratua fidagarria dela eta emaitza onak eskaintzen dituela ziurtatzeko, ordea, ereduak sortzeko erabilitako lagin taldetik at dauden laginen gantz edukia aurresan behar da, horretarako tenperatura eta gantz eduki ezberdineko laginen espektroak erabiliz. Emaitza hauek 2. taulan adierazi dira eta hauek objetiboki baloratzeko 3. taulan ageri diren errore erlatiboak kalkulatu dira.

2. taula. Kalibratuaren balidazioko emaitzak.

Lagina	Erreferentziazko gantz edukia (%)	Aurresandako gantz edukia (%)			
		T guztiak	19 ºC	24 ºC	30 ºC
661-P	3,47	3,04 ± 0,05	3,1 ± 0,3	3,1 ± 0,11	3,0 ± 0,11
663-P	1,32	1,23 ± 0,05	1,2 ± 0,2	1,26 ± 0,08	1,3 ± 0,10
672-P	0,25	0,18 ± 0,06	0,11 ± 0,02	0,20 ± 0,03	0,2 ± 0,11
675-P	0,64	1,0 ± 0,14	0,8 ± 0,3	1,07 ± 0,004	1,1 ± 0,11
679-P	2,41	2,68 ± 0,05	2,7 ± 0,2	2,65 ± 0,003	2,64 ± 0,08
684-P	0,18	0,2 ± 0,13	0,1 ± 0,2	0,22 ± 0,04	0 ± 1,3

3. taula. Kalibratuak sortutako emaitzen balorazio estatistikoa.

	Batezbesteko balioa	Errore absolutua	Errore erlatiboa (%)	Desbideratzea
Osoa	2,88	0,28	9,6	0,16
Erdigaingabetua	1,06	0,20	19,3	0,12
Gaingabetua	0,25	0,07	53,7	0,12

Emaitza hauetan ikus daitekeenez kalibratuak dituen helburuak ondo betetzen ditu, gai da behi-esnearen NIR espektro batetik abiatuz, ohikoa den edozein gantz eduki zein tenperatura duelarik, honen gantz edukia aurresateko onargarria den errore batekin. Gantz eduki baxuko esneentzat errore erlatiboak altuagoak izanik ere, balioak hain baxuak direnez, lortutako errore absolutuak onak baitira.

4. Ondorioak

Aztertu diren ereduak ikusiz ondorioztatu daiteke NIR espektroskopia eta AOTECHen espektrometroa egokiak bezain baliagarriak direla esnearen industrian kalitatearen kontrola egiteko. Metodo tradizionalek ez bezala espektroskopiak berehalako emaitzak eskain ditzake, produkzioaren zuzeneko kontrola ahalbidetuz, egon daitezkeen akatsak edo anomaliak detektatuz, eta era berean zuzenketak ahal bezain azkar egitea ahalbidetuz. Honek izan daitezkeen galerak edo baztertu beharreko produkzioa minimizatzen laguntzen du, enpresaren ekonomiari zein ingurugiroari lagunduz. Gainera metodo ez-destruktiboa da eta ez du inolako erreaktibo kimiko zein prozesaketaren beharrik, gastu horiek aurreztuz.

5. Etorkizunerako planteatzen den norabidea

Lan honetan erakutsi diren emaitzak aurrera pauso bat dira baina lan gehiago egin beharra dago espektrometro hau industrian lan egiteko prest egon dadin: lehenik esnea mugimenduan dagoen bitartean espektroak lortzeak eraginik duen ikusi behar da, eta hala bada kalibratuak berritu. Honetarako zirkuitu itxi bat duen simulagailu bat eraiki da eta horrez gain enpresa batean instalatu da espektrometroa, orain espektro eta datu berriekin lan egiteko.

Bestalde, NIR espektroskopiarekin esnearen beste ezaugarri batzuk determinatzen diren lanak jada argitaratu dira (Mohamed et al., 2021), hala nola proteina, laktosa, urea, pHa, estraktu lehorra, etab. Beraz, hauentzat ere industrian erabil daitezkeen kalibratuak lortzea da hurrengo helburuetako bat, gantzarekin egin den bezala.

6. Erreferentziak

Anastas, P. T. eta Warner, J. C. (1998): *Green Chemistry: Theory and Practice*, Oxford University Press, Oxford.

AOAC International (2007): *Official Methods of Analysis*. 989.05 metodo ofiziala.

AOAC International (2007): *Official Methods of Analysis*. 2000.18 metodo ofiziala.

dos Santos Pereira, E. V., de Sousa Fernandes, D. D., Ugulino de Araújo, M. C., Gonçalves Dias Diniz, P. H., Sucupira Maciel, M. I. (2020): Simultaneous determination of goat milk adulteration with cow milk and their fat and protein contents using NIR spectroscopy and PLS algorithms, *LWT - Food Science and Technology*, 127, 109427.

Mohamed, H., Nagy, P., Agbaba, J., Kamal-Eldina, A. (2021): Use of near and mid infra-red spectroscopy for analysis of protein, fat, lactose and total solids in raw cow and camel milk, *Food Chemistry*, 334, 127436.

Růžičková, J. eta Šustová, K. (2018): Determination of selected parameters of quality of the dairy products by NIR spectroscopy, *Czech Journal of Food Sciences*, 24 (6), 255-260.

7. Eskerrak eta oharrak

Eskerrak AOTECH enpresari, lan honen oinarri den espektrometroa garatu eta ikerkuntza hau finantzatu dutelako.

Aspergillus nidulans onddoaren garapenaren kontrol genetikoa: FlpA ustezko ziklinaren identifikazioa eta ezaugarritze funtzionala

Agirrezabala, Z.[1], Otamendi, A.[1], Espeso, E.[2], Etxebeste, O.[1]

[1]*Laboratory of Biology, Department of Applied Chemistry, Faculty of Chemistry, University of The Basque Country, Manuel de Lardizabal 3, 20018 San Sebastian.*
[2]*Department of Cellular and Molecular Biology, Centro de Investigaciones Biológicas Margarita Salas (CSIC), Ramiro de Maeztu 9, 28040 Madrid.*
ziortzagirrezabala@gmail.com

Laburpena

Aspergillus nidulans onddoa modelo organismo nagusietako bat da onddo harizpitsuen ugalketa asexualaren kontrol genetiko eta molekularraren azterketan. *Aspergillus* generoko onddo batzuk patogenoak izanik eta beste batzuk industria mailan hainbat aplikazio dutenez, beren garapen eta ugalketaren kontrol genetikorako mekanismoak ezagutzea garrantzitsua da. Lan honetan, *A. nidulans*-en FLIP57 andui mutante akonidialaren (espora asexualik gabekoa) genomaren azterketa bioinformatikoaz baliatuz, honen fenotipoa eragiten duen mutazioa daraman genea identifikatu (*An10640*) eta geneak kodetzen duen FlpA ustezko ziklinak konidioforoen (ugalketa egitura asexualak) garapenean esku-hartze garrantzitsua duela frogatu da.

Hitz gakoak: onddo harizpitsu, *Aspergillus nidulans*, garapen asexual, transkripzio faktore, seinaleen transdukzio

Abstract

The fungus *Aspergillus nidulans* is one of the main species used as a reference for the study of the genetic and molecular mechanisms controlling fungal asexual development. Due to the patogenicity of some species from the genus *Aspergillus* or the industrial value of others, it is relevant to study the mechanisms controlling their development. In this work, the genome of the *A. nidulans* aconidial mutant (lacking asexual spores) FLIP57 was sequenced, the gene (*An10640)* including the mutation causing its phenotype identified and the role played by the putative cyclin FlpA in the production of conidiophores (asexual developmental structures) characterized.

Keywords: filamentous fungi, *Aspergillus nidulans*, asexual development, transcription factor, signal transduction

1. Sarrera eta motibazioa: Onddo harizpitsuak eta *Aspergillus* generoa.

Onddoena, 2-4 milioi espezie biltzen dituen sailkapen konplexuko erreinu bat da (Hawksworth and Lücking, 2017). Horien artean, harizpi itxurako onddoen taldea desberdintzen da, hauek hifa izeneko egitura zelular tubularren arabera hazten direlako. *Aspergillus*, harizpi itxurako onddoen genero bat da, taxonomiari dagokionez, *Ascomycota* filumean, *Pezizomycotina* subfilumean eta *Eurotiomycetes* klasearen barruan sailkatzen dena. Orain arte, 350 espezie inguru barne hartzen ditu genero honek (de Vries et al., 2017). Garrantzia ekonomiko eta mediko handiko generoa da, espezie asko fruten, hazien, animalia edo pertsonen patogenoak baitira (*A. fumigatus* edo *A. flavus*, esaterako), beste batzuk produktu komertzialen iturri moduan erabiltzen diren bitartean (*A. niger* edo *A. oryzae*, adibidez) (Meyer et al., 2020). *Aspergillus nidulans* aspalditik eredu organismo moduan erabili izan da hainbat prozesu zelular eta garapen prozesuak aztertzeko (Ojeda-López et al., 2018), besteak beste, laborategi mailan kultibatu eta manipulatzeko duen erraztasunagatik, patogenoa ez izateagatik, garapen prozesuak (sexuala eta asexuala; ikus aurrerago) modu erraz eta errepikakorrean eragiteko prozedurak eskura izateagatik, edo manipulazio genetikoa erreza eta merkea izateagatik (Etxebeste eta Espeso, 2020).

Ugalketari dagokionez, *Aspergillus* generoko espezieak ugalketa sexuala zein asexuala burutzeko gai dira (Ojeda-López et al., 2018). Sexuala espezieen % 30-40an ematen dela kalkulatu da, gainontzeko % 60-70ak bere genoman ugalketa sexualerako geneak eduki arren (Dyer & O'Gorman, 2011). Garapen asexuala (ikus 1. irudia) mitosian oinarritzen da; alegia, elkarren artean genetikoki berdinak (klonak) diren milioika espora ekoizten dira. Ugalketa sexuala, berriz, meiosian oinarrituta dago eta elkarren artean genetikoki desberdinak diren esporak ekoizten dira (parentalen genomen konbinazioz lortuak). Era honetan, uler daiteke garapen asexuala zabalkunderako mekanismo nagusia izatea, garapen sexuala iraupenera eta trukaketa genetikora bideratua dagoen bitartean.

Ugalketa asexualari dagokionean, konidio izenez ezagutzen diren esporen bitartez ematen da hau (ikus 1A irudia). Konidioak, inguruneko baldintzak egokiak direnean ernamuindu egiten dira, hau da, espora bakoitzetik egitura tubular bat sortzen hasten da. Egitura horri germinula deritzo eta hazten jarraituz, adarkatuz joaten dira hifa izeneko egiturak sortzeko. Azkenik, eta baldintzek hala agintzen badute (elikagaien urritasuna edo beste hainbat seinaleen presentzia edo gabezia), hifa batzuetatik konidioak sortzeko funtzioa duten konidioforo izeneko egiturak sortzen hasten dira. Azkenik, esporak ingurura zabalduz, onddoaren bizi zikloa ixten da.

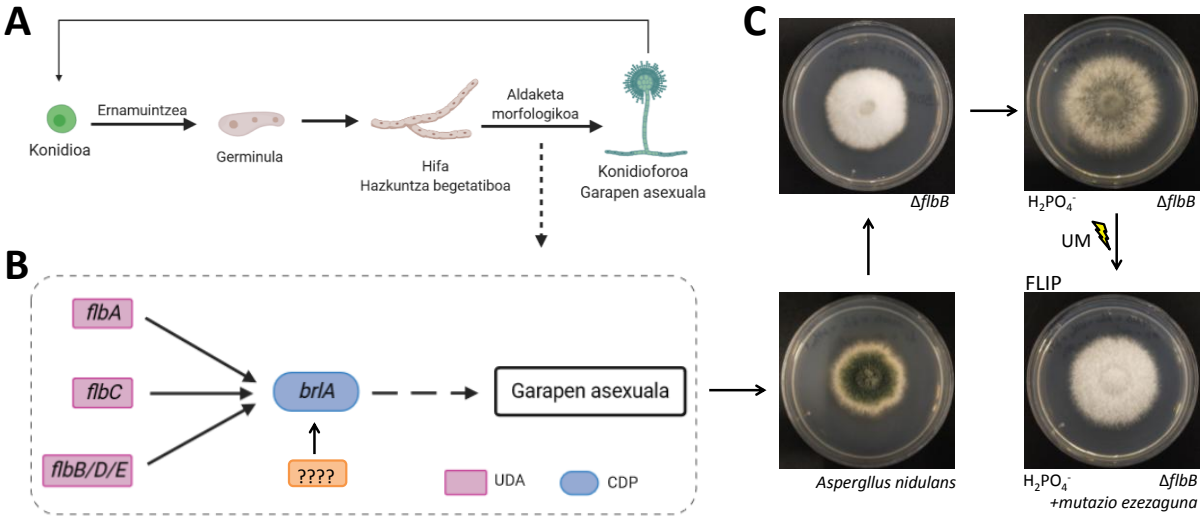
2. Arloko egoera eta ikerketaren helburuak: *Aspergillus nidulans* eta honen garapenaren kontrol genetikoa.

Aspergillus generoko espezieen ugalketa ziklo sexual eta asexuala aztertzeko erabiltzen den eredu organismo nagusia *Aspergillus nidulans* espeziea da (Etxebeste eta Espeso, 2020; Meyer et al., 2016). Espezie honetan identifikatu eta ezaugarritu dira orain arte ezagutzen diren bi garapen ziklo hauen kontrolean parte hartzen duten gene/proteina gehienak.

Aspergillus nidulans-en espora asexualak konidio izenez ezagutzen dira eta konidioforo izeneko egituratan ekoizten dira. Egitura hauen garapena eta ekoizpena bi bide genetikok erregulatzen dute nagusiki (ikus 1B Irudia). Alde batetik, UDA (*Upstream Developmental Activation*) bidea, zeinak inguruko baldintzen arabera konidiazioa emango den ala ez erabakiko duen. Gutxienez hiru azpibidek osatzen dute UDA bidea, hurrenez hurren, *flbA*, *flbB/D/E* eta *flbC* geneek definitutakoek, hain zuzen (arroxaz adieraziak irudian). FlbB, FlbC eta FlbD transkripzio faktoreak (TF) dira eta, beraz, hainbat generen adierazpena kontrolatzen dute. Diana horien artean *brlA* genea dago, konidioforoen garapena kontrolatzen duen CDP (*Central Developmental Pathway*) bide genetikoko lehen elementua eta prozesuaren kontrolean funtzio ezinbestekoa jokatzen duena (urdinez irudian). BrlA-k ere, transkripzio

faktorea izanik, CDP bideko hainbat generen espresioa erregulatzen du, konidiazioa emateko beharrezko aldaketa morfologikoak dagozkien momentuan eta lekuetan gauza daitezen.

1. irudia. *Aspergillus nidulans* onddoaren hazkuntza eta garapen asexualaren kontrol genetikoa. A) Onddoaren bizitza zikloaren eskema sinplifikatua, hazkuntza begetatiboa eta garapen asexualaren oinarri diren hifak eta konidioforoak erakusten direlarik. B) Konidioforoen garapenaren kontrol genetikoaren eskema sinplifikatua, UDA (arroxaz) eta CDP (urdinez) bideen erregulatzaile nagusiak erakusten direlarik. C) Konidioak sortzeko arazoa duten mutante batzuk (*flbB* genea faltan duen anduia, esaterako), $H_2PO_4^-$-dun (0.65M) hazkuntza medioan fenotipoa itzularazi eta konidioak ekoitz ditzakete, gatz honen presentzia garapen asexualaren eragile izan daitekeela iradokiz. Ezaugarri fenotipiko hau, Δ*flbB* anduitik abiatuz eta argi ultramorearen bidez sortu ziren mutante berrien artean, baldintza horietan akonidialak ziren mutanteak (FLIP adieradunak) isolatzeko erabili zen. Horrek, konidiazioaren kontrolean parte hartuko luketen gene/proteina berriak identifikatu/ezaugarritzeko aukera emango luke (laranjaz B atalean).



UDA bideko generen bat genomatik ezabatzen bada, *brlA*-ren adierazpena inhibitu edo atzeratu egiten da. Ondorioz, mutante horiek *fluffy* (kotoitsu) deritzon fenotipo akonidiala erakusten dute. Honen adibide da Δ*flbB* mutantea, *flbB* genea genomatik ezabatuta duena (1C irudia). FlbB transkripzio faktorerik egon ezean, *brlA* genearen espresioa ezin izango da aktibatu eta, ondorioz, CDP bide genetikoa blokeatuta geratzen da, konidioforoak garatzeko eman beharreko aldaketa morfologikoak inhibituta geratzen direlarik. Hala ere, ikusi da badaudela hainbat estimulu (elikagaien agorketa, argia, edo gatz edo karbohidrato espezifikoen kontzentrazio altuak, besteak beste) ugalketa asexuala bultzatzen dutenak (Etxebeste eta Espeso, 2020). Δ*flbB* mutantearen kasuan, adibidez, ikusi zen hazkuntza baldintza estandarretan erakusten duen fenotipo akonidiala atzera itzuli daitekeela eta konidiazioa eragin fosfato ($H_2PO_4^-$; 0.5-0.65M) kontzentrazio handiko medioan hazten bada (1C irudia) (Otamendi et al., 2019). Honek, UDA bideaz gain, *brlA*-ren indukziorako bide genetiko alternatiboak egon daitezkeela iradokitzen du (laranjaz 1go irudiko B atalean).

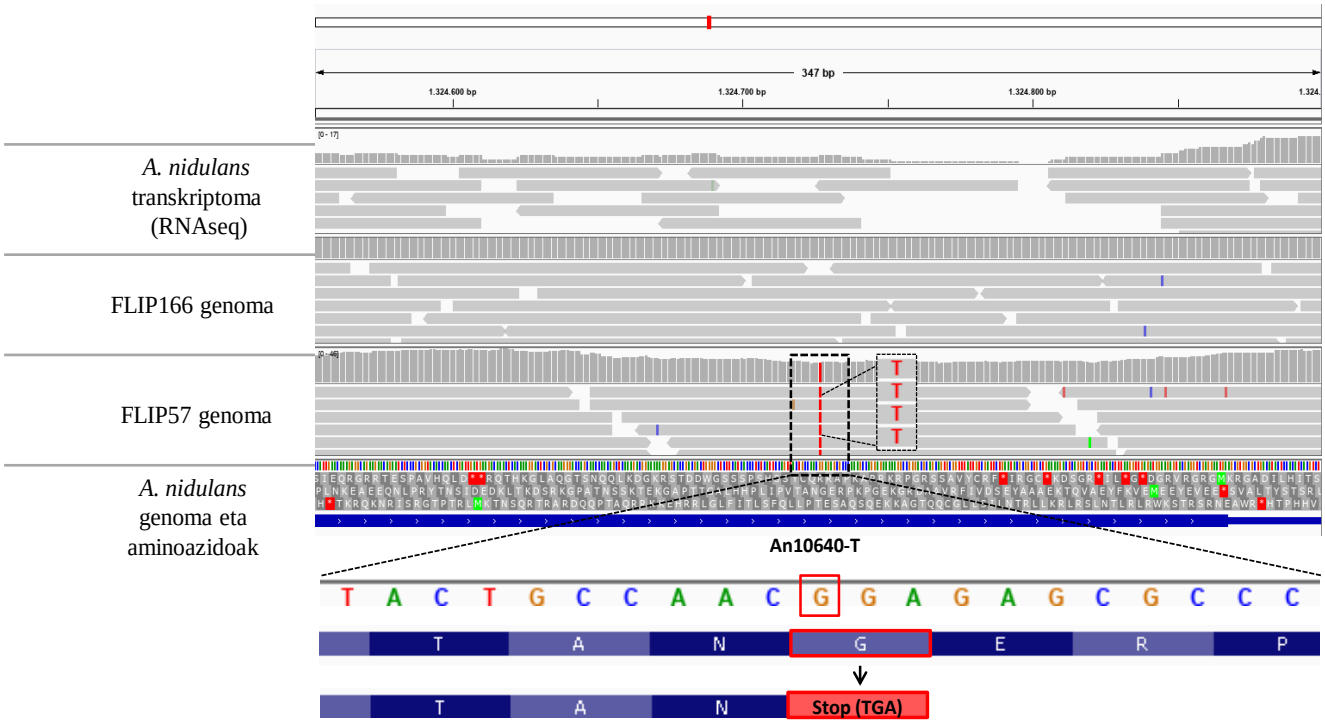
Ustezko bide alternatibo horietan parte hartzen duten geneak identifikatzeko, Otamendi et al. (2019) lanean, fosfatodun (0.65M) kultura medioan fenotipo akonidiala zuten 81 Δ*flbB* mutante (FLIP, *fluffy* in phosphate, mutanteak) isolatu ziren mutagenesi bidez (1C irudia). Mutante hauek, *flbB* genearen delezioaz gain, baldintza hauetan garapen asexuala inhibitzen duen beste mutazio ezezagunen bat dute. Hori kontutan hartuta, FLIP mutante horietako baten (FLIP166) azterketak, konidiazioaren kontrolean parte hartzen zuten bi generen identifikazioa eta ezaugarritzea ahalbidetu zuen (Otamendi et al., 2019). Ildo beretik jarraituz, lan honetan FLIP57 mutantea aztertu da, bere genomaren azterketa bioinformatikoa eginez garapen asexualaren kontrolean parte har lezaketen gene berriak identifikatzeko, batetik, eta identifikatutako gene eta horiek kodetzen dituzten proteinen ezaugarritze funtzionala burutzeko, bestetik.

3. Ikerketaren muina

3.1. *An10640* genearen mutazio batek eragin lezake FLIP57 fenotipoa

FLIP57 mutantearen (Δ*flbB* fondo genetikoa) genoma Stabvida enpresan (Caparica, Portugal) sekuentziatu zen. Genoma osoaren hainbat kopia ordezkatzen zuten 72 nukleotidoz osatutako milioika sekuentzia (*read*-ak) lortu ziren. Lortutako emaitzak, aurrez eskura zeuden *A. nidulans*-en genomaren erreferentziazko bertsioaz (Basenko et al., 2018), FLIP166 mutantearen (Otamendi et al., 2019) genomarekin, eta transkriptoma batekin (Oiartzabal-Arano et al., 2015) konparatu ziren. IGV (*Integrative Genomics Viewer*) programa erabiliz, FLIP57 anduian azaldu bai baina, beste genoma/transkriptomatan azaltzen ez ziren mutazio exonikoak bilatu ziren (ikus 2. irudia). FLIP57 eta FLIP166 (Otamendi et al., 2019) anduien fenotipo akonidialaren eragilea zen mutazioa gene ezberdinetan zegoela jakinik, *An10640* genearen exoi batean zegoen mutazio bat identifikatu zen (lauki ez jarraia 2. irudian). Mutazio horrek G bat T batez ordezkatzen zuen, 347. kodoian GGA(Gly)-TGA(stop) ordezkapena eraginez. Honek stop seinale goiztiar bat sartuko luke, sortuko litzatekeen proteinak berezkoak baino 45 aminoazido gutxiago izango lituzkeelarik. Mutazio hau FLIP57-ren fenotipoaren eragile izateko hautagai nagusi bezala hartu zen. Fosfatodun medioan konidioen ekoizpena inhibituko lukeenez, *flpA* adiera eman zitzaion *An10640* geneari (*fluffy in phosphate* A).

2. irudia. *A. nidulans*-en erreferentziazko genoma eta transkriptomekiko FLIP57-ren genomak duen mutazioaren irudikapena. Lauki ez-jarraiak mutazioaren kokapena adierazten du, beheko sekuentziak mutazio horrek proteinan eragingo lukeen aldaketa adierazten duelarik. IGV *software*-a erabiliz lortutako irudia.



3.2. FlpA proteina ziklina bat izan liteke, ziklo zelularraren erregulatzailea

InterPro izeneko plataforman (Blum et al., 2021) egindako FlpA-ren aminoazido sekuentziaren azterketaren arabera, FlpA proteina ziklina (IPR043198 eremua; 23 eta 391. aminoazidoen artean kokatua) bat izan daitekeela ikusi zen (ikus 3A irudia). Ziklinak, ziklo zelularraren erregulazioan parte hartzen duten proteinak dira (Paolillo et al., 2018). Hauek, ziklinen menpeko kinasa (CDK; *Cyclin-Dependent Kinase*) izeneko entzimekin elkartuz konplexuak osatzen dituzte, kinasa horiek fosforilazioz aktibatuz edo desaktibatuz.

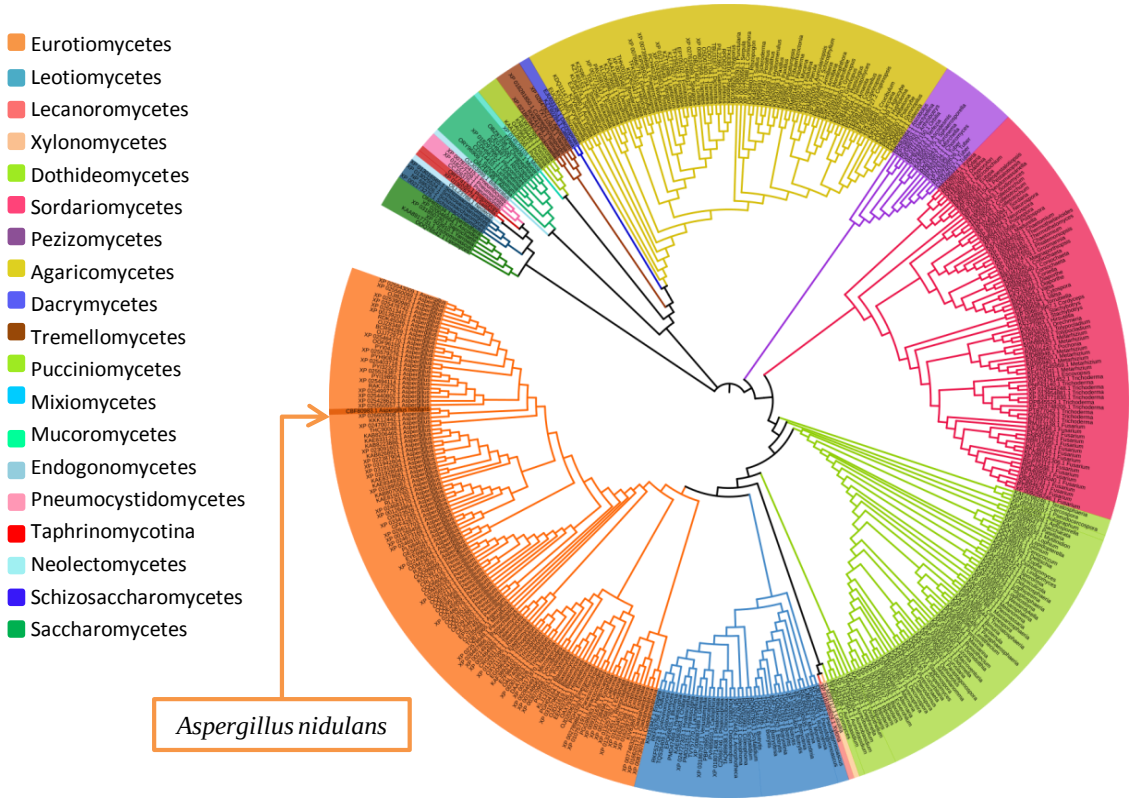
Horrez gain, 3B irudian Swiss-Model plataformaren bitartez (Waterhouse et al., 2018) lortutako FlpA proteinaren egitura hirudimentsionalaren aurreikuspena erakusten da. Eredu hau, proteina honen homologoen aminoazido kontserbatuak erreferentziatzat hartuz eraikitzen da (ikus 3B irudia).

3. irudia. FlpA proteinaren aminoazido sekuentziaren azterketa. A) *A. nidulans* onddoaren *An10640* geneak kodetzen duen FlpA proteinaren sekuentziaren azterketa InterPro plataforman. B) Swiss-Model plataformaren bidez egindako FlpA proteinaren egitura hirudimentsionalaren aurreikuspena (ezkerrean) eta eredu hau FlpA-ren sekuentzia basatiaren zein eremuri dagokion erakusten duen irudia (eskuinean). Gorriz FlpA-n mutatua dagoen glizina adierazten da.

3.3. FlpA ustezko ziklina onddo klase guztietan kontserbatuta dago

FlpA proteinak onddoetan duen kontserbazio maila aztertzeko, bere aminoazido sekuentzia bilaketa-termino bezala erabiliz, proteina honen edo kontserbatuenen (ortologoak) bilaketa burutu zen organismo ezberdinetan (BLAST), NCBI (*National Center of Biotechnology Information*) datu basean. Lortutako ustezko ortologoak sailkatu egin ziren, ustez, FlpA-ren ortologoak ez zirenak baztertuz eta onddo espezie bakoitzeko kontserbazio maila altuena zuen (*score*, *e value* eta *coverage* parametroen arabera) sekuentzia bakarra aukeratuz. Sekuentzia horiekin guztiekin zuhaitz filogenetikoa eraiki (MegaX) eta editatu (iTOL) egin zen (4. irudia). Bertan ikus daitekeenez, FlpA proteinaren kontserbazioa oso zabala da onddoetan, onddoen klase guztietan edo ia guztietan identifikatu baitziren FlpA-ren ortologoak. Horrenbestez, kontserbazio maila handia dela eta, proteina honek funtzio garrantzitsu bat izan dezakeela pentsa liteke.

4. irudia. *Aspergillus nidulans* onddoaren *An10640* geneak kodetzen duen FlpA proteinaren kontserbazioa adierazten duen zuhaitz filogenetikoa. Irudi honetan, FlpA proteinaren ortologoa duten espezieak bildu dira; adarrak elkarrengandik zenbat eta hurbilago egon, orduan eta kontserbazio-maila handiagoa izango dute dagokion proteinek. Zuhaitz filogenetikoan agertzen diren adarretako bakoitza espezie baten FlpA-ren ortologo baten adierazle da. Adar horien koloreek berriz, onddo klase ezberdinak adierazten dituzte (ezkerrean adierazita).

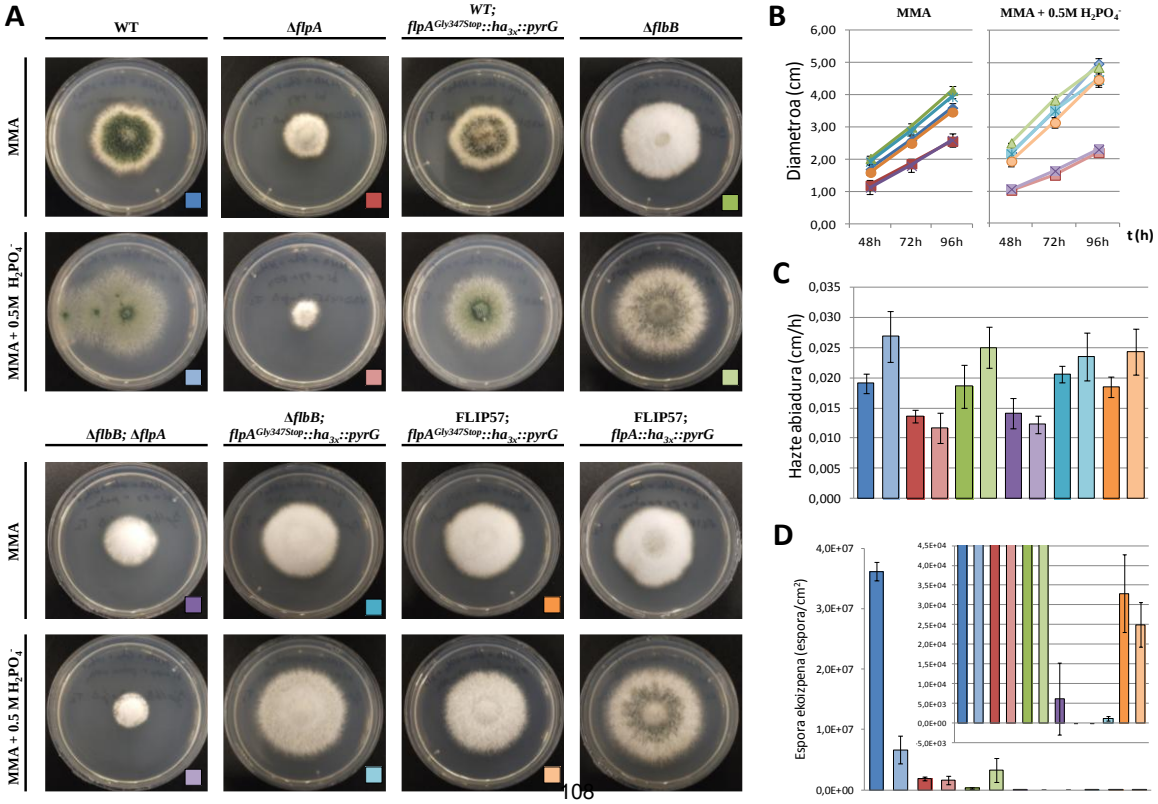


3.4. FlpA ustezko ziklinak konidiazioaren kontrol genetikoan parte har lezake

Aurreko atalean deskribatutako mutazioa FLIP57-ren fenotipoaren eragilea zen ala ez aztertzeko, hainbat transformazio burutu eta hainbat andui errekonbinante sortu zen. Batetik, FLIP57-ren zelulak sintetikoki sortutako *flpA::ha*$_{3x}$*::pyrG* DNA konstrukzio batekin transformatu ziren. Konstrukzio honek genearen aldaera basatia zuen, zeinak FLIP57-ren forma mutantea ordezkatuko zukeen. Kontrol bezala *flpA*$^{(Gly347Stop)}$*::ha*$_{3x}$*::pyrG* aldaera erabili zen. Lehen DNA konstrukzioak FLIP57-k fosfatodun medioan zuen fenotipoa itzularazten zuen bitartean, bigarrenarekin FLIP57-ren fenotipo bera mantentzen zen (5A irudia, beheko eskuineko bi zutabeak). Bestetik, Δ*flbB* anduiaren (BD177) zelulak ere bi DNA konstrukzio horiekin transformatu ziren. Lehenak, fosfatotan andui parental horrek zuen fenotipoa manten arazten zuen bitartean (ez erakutsia), bigarrenak, forma mutanteak alegia, FLIP57 fenotipoa eragiten zuen kultura medio horretan (5A irudia, beheko bigarren zutabea). Bi emaitza hauek, *flpA*-ren Gly347Stop mutazioa FLIP57 fenotipoaren eragilea dela baieztatu zuten.

Ondoren, eta FlpA proteinak eta identifikatutako mutazioak *A. nidulans*-en hazkuntza eta garapenaren kontrolean bete lezaketen funtzioa edo izan lezaketen eragina aztertzeko, andui errekonbinante gehiago sortu eta kolonien hazkuntza abiadura (5B eta 5C irudiak) nahiz konidio produkzioak kuantifikatu ziren (5D irudia). Horrela, andui basati (konidioduna) baten zelulak transformatu ziren aurrez aipatutako bi konstrukzioekin. *flpA* genea ezabatuta zuten anduiak ere sortu ziren, bai fondo genetiko basati honetan baita Δ*flbB* fondo genetiko batean ere (5A irudia). Era honetan, *flpA* genearen delezioak hazkuntza eta konidio ekoizpenean izan lezakeen eragina aztertu ahal izan zen eta Gly347Stop mutazioaren eraginarekin konparatu (5B-D irudiak). Eragindako ordezkapen genomiko guztiak ondo gertatu zirela baieztatu zen transformanteen eta parentalen (basatia, BD177 eta FLIP57) DNA genomiko laginak erauziz eta *flpA locus*-a aztertuz PCR eta DNA sekuentziazio bidez.

5. irudia. Andui transformante (Δ*flpA*, WT;Gly347Stop, Δ*flbB*;Δ*flpA*, Δ*flbB*;Gly347Stop eta FLIP57;*flpA*) eta andui parentalen (WT, BD177 eta FLIP57) arteko konparaketa fenotipikoa AMM (laborategian onddoak hazteko erabiltzen den medio minimoa) eta $H_2PO_4^-$-dun (0.5M) AMM kultibo medio solidoetan. A) MAD1425 (WT), BD177 eta FLIP57 fondo genetikoak eta hauetatik sortutako andui errekonbinanteen fenotipoak hazkuntzaren 72. orduan. Plakak 37 ºC-tan hazi ziren. Plaken diametroa 5,5 cm-takoa da. B) Hazkuntza abiadurak, andui bakoitzaren kolonien diametroa (cm) hazkuntzaren 48, 72 eta 96. orduetan neurtuta, dagozkien desbideraketa estandarrekin adierazita. C) Andui bakoitzaren batazbesteko hazte abiadura (cm/h) eta balio hauen desbideraketa estandarra. D) Andui bakoitzaren batazbesteko espora ekoizpena (72h) azalera unitateko eta balio bakoitzaren desbideraketa estandarrak. Batazbesteko balio eta desbideraketa estandarren balio guztiak gutxienez hiru erreplikatatik lortu dira.



Alde batetik, fondo genetiko basatian, *flpA*ren Gly347Stop mutazioak ez du fenotipoan eragin nabariegirik izan. Honen ondoan, gene osoaren ezabaketaren eragina nabaria da (ikus 5A irudia). Beraz, mutazio honek eragindako proteinaren azken 45 aminoazidoen gabeziak FlpA-ren aktibitatearen galera partziala eragiten duela ondoriozta daiteke. Bestalde, genearen delezioak fenotipo akonidial oso argia erakusten du, ez bakarrik fosfatodun medio batean, baita hazkuntza medio estandarrean ere. Gly347Stop mutazioak onddoaren hazkuntzan eragin esanguratsurik ez duen arren, FlpA proteinaren gabeziak kolonien hazkuntza erradiala ere kaltetzen duela proposa liteke.

4. Ondorioak

- Gure taldeak isolatutako FLIP mutanteen bildumak *A. nidulans*-en hazkuntza eta garapenaren kontrolean parte hartzen duten gene/proteina berrien identifikazioa ahalbidetzen du.

- *flpA* genearen 347. kodoiko G-T mutazioak eragiten du FLIP57 fenotipoa.

- Zerbitzari bioinformatikoen arabera, FlpA-k ziklina funtzioa izango luke. Ziklina hau onddo erreinuko klase guztietan edo ia guztietan legoke kontserbaturik, bere funtzioa garrantzitsua dela iradokiz.

- FlpA-ren aktibitate galerak, hazkuntza eta garapenaren inhibizioa eragiten du. Proteinaren C-terminal ertzak garrantzia txikiagoa izango luke funtzio hauetan N-terminal eremuak baino.

5. Etorkizunerako planteatzen den norabidea.

-Ziklina bat balitz, FlpA-ren lokalizazio subzelularra aztertu beharko litzateke fluoreszentzia mikroskopia bidez eta ziklo zelularraren fase desberdinetan. Horretarako, FlpA::GFP kimera adierazten duten andui errekonbinanteak sortu dira eta laster aztertuko dira, eta aurrerago organulu desberdinen markatzaileekin ko-lokalizazio probak ere egingo dira.

-Bigarrenik, FlpA-ren galerak zein bide genetiko kaltetzen dituen aztertu nahi da. Horretarako, RNA-seq teknika erabiliko da ikusteko Δ*flpA* anduian zein generen adierazpena dagoen desregulaturik.

6. Erreferentziak

Basenko, E. Y., Pulman, J. A., Shanmugasundram, A., Harb, O. S., Crouch, K., Starns, D., Warrenfeltz, S., Aurrecoechea, C., Stoeckert, C. J., Jr., Kissinger, J. C., Roos, D. S., & Hertz-Fowler, C. (2018). FungiDB: An Integrated Bioinformatic Resource for Fungi and Oomycetes. *J Fungi (Basel), 4*(1). https://doi.org/10.3390/jof4010039

Blum, M., Chang, H. Y., Chuguransky, S., Grego, T., Kandasaamy, S., Mitchell, A., Nuka, G., Paysan-Lafosse, T., Qureshi, M., Raj, S., Richardson, L., Salazar, G. A., Williams, L., Bork, P., Bridge, A., Gough, J., Haft, D. H., Letunic, I., Marchler-Bauer, A., Mi, H., Natale, D. A., Necci, M., Orengo, C. A., Pandurangan, A. P., Rivoire, C., Sigrist, C. J. A., Sillitoe, I., Thanki, N., Thomas, P. D., Tosatto, S. C. E., Wu, C. H., Bateman, A., & Finn, R. D. (2021). The InterPro protein families and domains database: 20 years on. *Nucleic Acids Res, 49*(D1), D344-d354. https://doi.org/10.1093/nar/gkaa977

de Vries, R. P., Riley, R., Wiebenga, A., Aguilar-Osorio, G., Amillis, S., Uchima, C. A., Anderluh, G., Asadollahi, M., Askin, M., Barry, K., Battaglia, E., Bayram, Ö., Benocci, T., Braus-Stromeyer, S. A., Caldana, C., Cánovas, D., Cerqueira, G. C., Chen, F., Chen, W., Choi, C., Clum, A., Dos Santos, R. A., Damásio, A. R., Diallinas, G., Emri, T., Fekete, E., Flipphi, M., Freyberg, S., Gallo, A., Gournas, C., Habgood, R., Hainaut, M., Harispe, M. L., Henrissat, B., Hildén, K. S., Hope, R., Hossain, A., Karabika, E., Karaffa, L., Karányi, Z., Kraševec, N., Kuo, A., Kusch, H., LaButti, K., Lagendijk, E. L., Lapidus, A., Levasseur, A., Lindquist, E., Lipzen, A., Logrieco, A. F., MacCabe, A., Mäkelä, M. R., Malavazi, I., Melin, P., Meyer, V., Mielnichuk, N., Miskei, M., Molnár, Á., Mulé, G., Ngan, C. Y., Orejas, M., Orosz, E., Ouedraogo, J. P., Overkamp, K. M., Park, H. S., Perrone, G., Piumi, F., Punt, P. J., Ram, A. F., Ramón, A., Rauscher, S., Record, E., Riaño-Pachón, D. M., Robert, V., Röhrig, J., Ruller, R., Salamov, A., Salih, N. S.,

Samson, R. A., Sándor, E., Sanguinetti, M., Schütze, T., Sepčić, K., Shelest, E., Sherlock, G., Sophianopoulou, V., Squina, F. M., Sun, H., Susca, A., Todd, R. B., Tsang, A., Unkles, S. E., van de Wiele, N., van Rossen-Uffink, D., Oliveira, J. V., Vesth, T. C., Visser, J., Yu, J. H., Zhou, M., Andersen, M. R., Archer, D. B., Baker, S. E., Benoit, I., Brakhage, A. A., Braus, G. H., Fischer, R., Frisvad, J. C., Goldman, G. H., Houbraken, J., Oakley, B., Pócsi, I., Scazzocchio, C., Seiboth, B., vanKuyk, P. A., Wortman, J., Dyer, P. S., & Grigoriev, I. V. (2017). Comparative genomics reveals high biological diversity and specific adaptations in the industrially and medically important fungal genus Aspergillus. Genome Biol, 18(1), 28. https://doi.org/10.1186/s13059-017-1151-0

Dyer, P. S., & O'Gorman, C. M. (2011). A fungal sexual revolution: Aspergillus and Penicillium show the way. *Current Opinion in Microbiology*, *14*(6), 649-654. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.mib.2011.10.001

Etxebeste, O., & Espeso, E. A. (2020). Aspergillus nidulans in the post-genomic era: a top-model filamentous fungus for the study of signaling and homeostasis mechanisms. *International Microbiology*, *23*(1), 5-22. doi:10.1007/s10123-019-00064-6

Hawksworth, D. L., & Lücking, R. (2017). Fungal Diversity Revisited: 2.2 to 3.8 Million Species. *Microbiol Spectr*, *5*(4). doi:10.1128/microbiolspec.FUNK-0052-2016

Meyer, V., Basenko, E. Y., Benz, J. P., Braus, G. H., Caddick, M. X., Csukai, M., de Vries, R. P., Endy, D., Frisvad, J. C., Gunde-Cimerman, N., Haarmann, T., Hadar, Y., Hansen, K., Johnson, R. I., Keller, N. P., Kraševec, N., Mortensen, U. H., Perez, R., Ram, A. F. J., Record, E., Ross, P., Shapaval, V., Steiniger, C., van den Brink, H., van Munster, J., Yarden, O., & Wösten, H. A. B. (2020). Growing a circular economy with fungal biotechnology: a white paper. *Fungal Biol Biotechnol*, *7*, 5. https://doi.org/10.1186/s40694-020-00095-z

Oiartzabal-Arano, E., Garzia, A., Gorostidi, A., Ugalde, U., Espeso, E. A., & Etxebeste, O. (2015). Beyond asexual development: modifications in the gene expression profile caused by the absence of the Aspergillus nidulans transcription factor FlbB. *Genetics*, *199*(4), 1127–1142. https://doi.org/10.1534/genetics.115.174342

Ojeda-López, M., Chen, W., Eagle, C. E., Gutiérrez, G., Jia, W. L., Swilaiman, S. S., Huang, Z., Park, H. S., Yu, J. H., Cánovas, D., & Dyer, P. S. (2018). Evolution of asexual and sexual reproduction in the aspergilli. *Stud Mycol*, *91*, 37-59. https://doi.org/10.1016/j.simyco.2018.10.002

Otamendi, A., Espeso, E. A., & Etxebeste, O. (2019). Identification and Characterization of Aspergillus nidulans Mutants Impaired in Asexual Development under Phosphate Stress. *Cells*, *8*(12). doi:10.3390/cells8121520

Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., & Tamura, K. (2018). MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Mol Biol Evol*, *35*(6), 1547-1549. doi:10.1093/molbev/msy096

Letunic, I., & Bork, P. (2019). Interactive Tree Of Life (iTOL) v4: recent updates and new developments. *Nucleic Acids Res*, *47*(W1), W256-W259. doi:10.1093/nar/gkz239

Paolillo, V., Jenkinson, C. B., Horio, T., & Oakley, B. R. (2018). Cyclins in aspergilli: Phylogenetic and functional analyses of group I cyclins. *Stud Mycol*, *91*, 1-22. doi:10.1016/j.simyco.2018.06.002

Waterhouse, A., Bertoni, M., Bienert, S., Studer, G., Tauriello, G., Gumienny, R., Schwede, T. (2018). SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Res, 46*(W1), W296-w303. doi:10.1093/nar/gky427

7. Eskerrak eta oharrak

Lan hau UPV/EHU-ko ikerketa taldeentzako deialdiaren barruko finantzazioa (GIU19/014) eta Eusko Jaurlaritzako PIBA (PIBA_2020_1_0032) eta Elkartek (KK-2019/00076) deialdietako finantzazioarekin burutu da.

BM15, BM18, BM29, BM36, BM39 konposatuen jarduera leishmanizidaren azterketa

Burguete-Mikeo, A.[1], Nguewa, P.[1]

[1]Nafarroako Unibertsitatea, ISTUN Osasun Tropikaleko Institutua, Mikrobiologia eta parasitologia saila, IdiSNA (Nafarroako Osasun Ikerketa Institutua). Irunlarrea 1, PK 31008 Iruñea

aburguetem@unav.es

Laburpena

Orain arte frogatu gabeko hogeita hamar konposatu baino gehiagoren jarduera leishmanizida aztertu zen. Horietatik hamahiruk 35 µM baino IC_{50} baxuagoa erakutsi zuten, eta emaitza hoberenak aurkeztu zituzten bost konposatuekin jarraitu zen lanean. Lan honetan BM15, BM18, BM29, BM36, BM39 konposatuen emaitzak aurkezten dira *Leishmania major* promastigote eta amastigoteetan, baita arratoien makrofago peritonealetan neurtutako zitotoxikotasuna ere. BM15 konposatua interesgarria suertatu zen amastigoteetan zuen jardueragatik, makrofagoen infekzioa eta makrofago bakoitzeko amastigoteen kopurua nabarmen murriztuz.

Hitz gakoak: leishmaniasia, parasitoak, zitotoxikotasuna

Abstract

More than thirty novel compounds were studied for their potential leishmanicidal activity. Thirteen of them showed an IC_{50} less than 35 µM and further assays was performed with five of the most promising compounds. In this work, the results of compounds BM15, BM18, BM29, BM36, BM39 in L. major promastigotes and amastigotes as well as their cytotoxicity in murine peritoneal macrophages are presented. The compound BM15 showed most promising results for its activity in amastigotes, significantly reducing the infection of macrophages and the number of amastigotes per macrophage.

Keywords: leishmaniasis, parasites, cytotoxicity

1. Sarrera eta motibazioa

Leishmaniasia flebotomo emeek transmititutako *Leishmania* generoko parasito protozoarioek eragindako gaixotasun talde bat da. Gaur egun, leishmaniasia osasun-arazo garrantzitsua da garapen bidean dauden herrialde askotan. Osasunaren Mundu Erakundearen (OME) datuen arabera, infekzio horiek endemikoak dira mundu osoko 98 herrialdetan. Urtero milioi bat leishmaniasi kasu inguru erregistratzen dira eta kalkulatutako hilkortasuna 20.000 heriotza baino gehiagokoa da[1–3].

Ornodunetan, Leishmaniak aflagelatuak (amastigoteak) eta intrazelularrak dira, eta ornogabeetan aldiz, flagelatuak (promastigoteak) eta estrazelularrak. Hogei espezie patogeno baino gehiago daude, eta eragindako gaixotasunak hainbat forma kliniko ditu, esaterako, larruazaleko lesio lokalizatuak eta leishmaniasi biszeralera edo kala-azar. Azkeneko hau gaixotasunaren formarik larriena da, eta ia beti hilgarria, tratatzen ez bada[1–3].

Europan, gaixotasuna hipoendemikoa da Mediterraneoko arroko herrialdeetan. Albania, Bosnia, Bulgaria, Zipre, Kroazia, Espainia, Frantzia, Grezia, Italia, Ipar Mazedonia, Malta, Montenegro, Portugal eta Turkian kasuak aurkitu dira[5].

2015ean leishmaniasia Espainian nahitaez aitortu beharreko gaixotasun gisa sailkatu bazen ere autonomia-erkidego guztientzat, azpideklarazio garrantzitsu bat susmatzen da, % 25-40koa leishmaniasi biszeralaren kasuan eta ia % 100ekoa larruazaleko leishmaniasian[6]. Euskal Herriari dagokionez, 1998-2018 denboraldian, gutxienez giza leishmaniasiaren 54 kasu deskribatu dira, adin guztietako

pertsonetan, eta zenbait kasutan GIB/HIESaren koinfekzioarekin lotuta. Kasu horietako hogei Nafarroan jakinarazi ziren eta hogeita hamalau Euskadin. Ipar Euskal Herriari buruzko informaziorik ez da lortu[7,8].

Une honetan, ez dago giza txerto eraginkorrik, eta emandako tratamendu nagusiak, besteak beste, antimonial pentabalenteak, B anfoterizina, paromomizina eta miltefosina dira[9]. Guztiek hainbat desabantaila dituzte, hala nola toxikotasuna eta kostu ekonomiko handia, administratzeko zailtasuna edo erresistentzien agertzea. Horregatik, egungo erronketako bat diana terapeutikoak eta tratamendu aktibo, seguru eta eskuragarri berriak aurkitzea da [10,11].

2. Arloaren egoera eta ikerketaren helburuak

Lehen aipatutakoa kontuan hartuta, honako helburu hauek proposatu dira lan honetarako:

- Jarduera leishmanizida duten konposatu berriak bilatzea.
- Etorkizun handieneko konposatuen zitotoxikotasuna aztertzea arratoien makrofago peritonealetan.

3. Ikerketaren muina

3.1. Konposatuak

Orain arte frogatu gabeko 30 konposatu baino gehiagoren jarduera leishmanizida zehaztu zen. Guztiek disolbagarritasun ona erakutsi zuten uretan eta konposatuen kontzentrazio gero eta handiagoak gehitu zitzaizkien parasitoei 0,19-64µM tartearen barruan. Horietako hamahiruk 13-35 µM arteko IC_{50} (% 50eko kontzentrazio inhibitzailea) aurkeztu zuten. Honek, prozesu biologiko edo biokimiko baten % 50a inhibitzen duen dosia definitzen du, eta emaitza hoberenak aurkeztu zituztenekin jarraitu zen lanean, BM15, BM18, BM29, BM36, eta BM39 hain zuzen ere.

3.2. Konposatuen jarduera *Leishmania major* espeziearen promastigoteen aurrean

Lanerako erabili ziren parasitoak hazkundearen fase logaritmikoan zeuden *Leishmania major* (*L. major*) espezieko promastigote proziklikoak izan ziren eta M199 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) medio osatuan hazi ziren[10]. Esperimenturako, 96 platertxoko plaketan erein ziren, eta konposatuen kontzentrazio gero eta handiagoak gehitu ziren 26 ºC-tan 48 orduz. Inkubazioaren ondoren, konposatuen IC_{50} zehaztu zen parasitoetan (hazkundearen % 50a inhibitu zuen kontzentrazioa) 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazolio bromuro metodoa (MTT) erabiliz.

3.3. Konposatuen zitotoxikotasuna arratoien makrofago peritonealetan

Ikerketarako, BALB/c arratoien makrofago peritonealak erabili ziren. Animaliekin egindako prozedura guztiak Nafarroako Unibertsitateko Animaliak Zaintzeko Etika Batzordeak onartu zituen. Makrofagoak DMEM (Gibco, USA) medioan erein ziren, % 0,5 penizilina/estreptomizina 10.000 U/mL eta % 10 HIFBSz osatua 96 platertxoko plaketan eta konposatuen kontzentrazio bakarra gehitu zitzaien (promastigoteetan neurtutako IC_{50}), 37ºC-tan eta % 5 CO_2 atmosferan. 48 orduko tratamenduaren ondoren, makrofagoen ehuneko biziraupen tasa zehaztu zen MTT metodoa erabiliz. Hurrengo taulan (1. taula), *L. Major* parasito promastigoteekin eta arratoien makrofago peritonealekin egindako saiakuntzetan lortutako emaitzak jasotzen dira.

1. Taula. BM15, BM18, BM29, BM36, BM39 konposatuen IC_{50} *L. major* espezieko promastigoteetan eta zitotoxikotasuna arratoien makrofago peritonealetan.

Konposatua	IC_{50} promastigote ± SD (µM)	Makrofago peritonealen % biziraupen tasa
BM15	17,77 ± 1,17	86
BM18	34,60 ± 0,84	93
BM29	28,69 ± 1,32	90
BM36	15,82 ± 0,05	94
BM39	14,77 ± 0,61	85
Paromomizina	84,01 ± 6,83	100
B Anfoterizina	0,19 ± 0,02	~100
Miltefosina	6,10 ± 0,44	~100

Konposatu guztiek paromomizinak baino IC_{50} baxuagoa aurkeztu zuten. Makrofagoen zitotoxikotasunari dagokionez, kasu guztietan biziraupen tasa % 85 baino altuago izan zen.

3.4. Konposatuen jarduera *L. major* amastigoteetan

Makrofagoak DMEM medioan erein ziren (3.3 atalean bezala osatua) 8 platertxoko plaka berezietan (Lab-Tek Chamber Slide System, Merck, Darmstadt, Germany) eta parasito infektiboak gehitu zitzaizkien, 1:20ko proportzioan (20 parasito makrofago bakoitzeko), eta 24 orduz inkubatu ziren 37ºC-tan. Behin makrofagoak infektatuta, hautatutako konposatuekin tratatu ziren eta berriro inkubatu ziren 37ºC-tan eta % 5 CO_2 atmosferan. 24 orduko tratamenduaren ondoren, makrofagoen infekzio-ehunekoa eta makrofago bakoitzeko zenbat amastigote zeuden zehaztu zen mikroskopio optikoarekin kontatuz. Lortutako emaitzak 2. taulan ageri dira.

2. Taula. BM15, BM18, BM29, BM36, BM39 konposatuen jarduera *L.major* amastigoteetan.

Konposatua	Konposatuaren konzentrazioa (µM)	Infekzio-ehunekoa ± SD	Amastigote/makrofago ± SD
BM15	8,88	36,25 ± 2,50	2,45 ± 0,08
BM18	34,60	38,24 ± 0,30	2,89 ± 0,20
BM29	28,69	28,40 ± 3,40	2,05 ± 0,08
BM36	15,82	69,89 ± 5,20	3,87 ± 0,60
BM39	14,77	74,35 ± 3,00	4,43 ± 1,90
Tratatu gabea	0,00	61,19 ± 8,45	3,87 ± 0,60

BM15, BM18 eta BM29 konposatuek nabarmen murriztu zuten makrofagoen infekzio-ehunekoa, bai eta makrofago bakoitzeko amastigoteen kopurua ere, kontrol gisa erabili ziren tratatu gabeko kultiboekin alderatuta. Bestalde, BM36 eta BM39 konposatuek ez zuten jarduerarik erakutsi saiatutako kontzentrazioetan. Nabarmentzekoa da BM15ek infekzioaren ehunekoa % 36,25era eta makrofago bakoitzeko amastigoteen kopurua 2,45era murriztu zuela, promastigoteetan neurtutako IC_{50} (17,77 µM) kontzentrazioaren erdia erabiliz.

4. Ondorioak

Aztertutako konposatuetako hamahiruk Leishmaniaren aurrean aktibitatea erakutsi zuten kontzentrazio baxuetan, eta horietako bosten zitotoxikotasuna probatzean, toxikotasun baxua hauteman zen. BM15 konposatua interesgarria suertatu zen amastigoteetan zuen jardueragatik, makrofagoen infekzioa eta makrofago bakoitzeko amastigoteen kopurua nabarmen murriztuz. Guzti hau kontuan

hartuta, ondorioztatu da, konposatuen jarduera leishmanizida aztertzea, bai gaur egun beste gaixotasun batzuen aurrean erabiltzen diren farmakoak, bai formulazio berriak, estrategia ona dela egungo erronkak lortzeko, hala nola leishmaniasiaren aurkako tratamendu berriak aurkitzea.

5. Etorkizunerako planteatzen den norabidea

- Konposatu gehiagoren jarduera leishmanizida zehaztea, konposatu aktiboen bankua handitzeko.
- Ikertutako konposatu aktiboen antzeko egitura duten konposatuak bilatzea.
- Konposatuek izan ditzaketen ekintza-mekanismoak aztertzea, eta jardueran parte hartzen duten geneak aztertzea.

6. Erreferentziak

1. Sundar, S. eta Rai M. (2002): "Laboratory diagnosis of visceral leishmaniasis" *Clin Diagn Lab Immunol*, 9(5):951-958.
2. Alvar, J. et al. (2012): "Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence" *PLoS One*, 7(5).
3. Ruiz-Postigo, J. A. et al (2020): "Global leishmaniasis surveillance, 2017–2018, and first report on 5 additional indicators", *Wkly Epidemiol Rec*., 95:281-300.
4. Sesma, B. eta Barricarte, A. (2009): "Leishmaniasis in Navarra: review of activities", *An Sist Sanit Navar*., Nafarroa, 20(2).
5. Fernández Martínez, B. et al (2019): "La Leishmaniasis En España: Evolución de los casos notificados a la Red Nacional De Vigilancia Epidemiológica desde 2005 a 2017 y resultados de la vigilancia de 2014 a 2017" *Cent Nac Epidemiol Inst Salud Carlos III Red Nac Vigil Epidemiológica*, Madril, 27(2):15-31.
6. Madrilgo erkidegoa (2018): Dirección General de Salud Pública. Consejería de Sanidad. Red de Vigilancia Epidemiológica de la Comunidad de Madrid. Enfermedades de Declaración ObligatoriaProtocolo de Vigilancia de la Leishmaniasis.
7. Nafarroako Osasun Publikoko Buletinak (1998-2018). [http://www.navarra.es/home_es/Gobierno+de+Navarra/Organigrama/Los+departamentos/Salud/Organigrama/Estructura+Organica/Instituto+Navarro+de+Salud+Publica/Publicaciones/Publicaciones+profesionales/Epidemiologia/Boletin+ISP.htm]
8. EAEko osasun publikoari buruzko txostenak eta aldizkari epidemiologikoak (1998-2018). [https://www.euskadi.eus/informacion/informe-de-salud-publica/web01-a3vipub/es/]
9. OMS (2010): "Control de las leishmaniasis: informe de una reunión del Comité de Expertos de la OMS sobre el Control de las Leishmaniasis", *Ser Inf Técnicos*, Geneva, 949.
10. Fernández-Rubio, C. et al. (2019): "Leishmanicidal activity of isoselenocyanate derivatives", *Antimicrob Agents Chemother*, 63(2):e00904-18.
11. Vacas, A. et al (2020): "LmjF.22.0810 from Leishmania major Modulates the Th2-Type Immune Response and Is Involved in Leishmaniasis Outcome", *Biomed*, Nafarroa, 8(11):452.

7. Eskerrak eta oharrak

Eskerrak eman nahi dizkiegu La Caixa fundazioari (LCF/PR/PR13/11080005) eta Nafarroako Kutxaren Fundazioari, Nafarroako Osasun Gobernuari (12/2017), Roviralta Fundazioari, Ubesol fundazioari, Laser Ebrori eta Inversores Garcilaso de la Vega SLri. Mila esker Maite Loperena aholku eta zuzenketa guztiengatik.

Maneiu estentsibopean ekoiztutako behor esnea abeltzaintza-dibertsifikazio moduan: Esnearen kalitatearen azterketa

Ana Blanco-Doval, Maria Ángeles Bustamante, Luis Javier Rodriguez Barron, Noelia Aldai

Lactiker Ikerketa Taldea, Farmazia Fakultatea, Euskal Herriko Unibertsitatea.
Unibertsitateko Pasealekua 7, 01006 Gasteiz (Araba)
ana.blancod@ehu.eus

Laburpena

Ekidoen artzaintza estentsiboak onura anitz dauzka; adibidez, paisaia mantendu, lurraren biodibertsitatea eta kalitatea hobetu eta suteak ekidin. Gainera, berotegi efektuko gasen emisioa txikiagotzen du hausnarkarien artzaintzarekin alderatuz. Euskal Herriko Mendiko Zaldia Euskal Herrian haragi ekoizpenerako erabiltzen den arraza da. Honekin batera behor esnearen ekoizpena dibertsifikaziorako aukera izan daiteke, aipatutako onurak areagotzeko eta landa-eremuak sendotzeko tresna izanik. Helburu honekin, edoskitze-aldi goiztiarreko esnea aztertu da, eta kalitatezko produktua lortu daitekeela frogatu da: serumeko proteinetan eta errautsean aberatsa eta gantz gutxikoa, baina bitamina liposoluble proportzio altuarekin. Honek etorkizunerako ikerketa bide bat ireki du.

Hitz gakoak: Euskal Herriko Mendiko Zaldia, ekidoen ekoizpena, dibertsifikazioa, esnearen karakterizazioa eta kalitatea

Abstract

Extensive grazing of equids has shown several benefits. It maintains the landscape, improves soil quality and land biodiversity, and prevents wildfires. Moreover, it mitigates greenhouse gas emissions in contrast to ruminant grazing. In the Basque Country, Basque Mountain Horses are bred for meat production. Adding mare milk to this production activity could be a diversification tool to reinforce the mentioned benefits as well as rural vitality. In this research, the quality of mare milk from an early lactation stage has been evaluated, and it has been proved that a quality milk can be obtained: rich in serum proteins and ash, and with very little fat, but with a high proportion of liposoluble vitamins. This has opened a new path for future research in Basque Mountain mares' milk.

Keywords: Basque Mountain Horse breed, equine production, diversification, milk characterization and quality

1. Sarrera eta motibazioa

Azken urteetan, ekidoek ingurumenean duten eragin positiboa frogatzen duten ikerketa zientifiko asko garatu dira. Alde batetik, jakina da zaldien bazkatze estentsiboak paisaia heterogeneoa mantentzen duela (Fleurance et al., 2016), eta biodibertsitatea eta lurraren kalitatea hobetzen dituela (Futa et al., 2017; Ringmark et al., 2019). Ekidoek otea (errekorra den landare zurkara) jaten dute kalitatezko belarrik eskuragarri ez dutenean, eta horrekin batera, baso-suteak prebenitzen laguntzen dute (Rigueiro-Rodríguez et al., 2012).

Bestalde, ingurune-egoera gogorretara erraztasunez moldatzen diren animaliak kontsideratzen dira. Ekidoek, hausnarkariak ez izanik, janari kantitate handiak digeritzeko gaitasuna daukate (Celaya et al., 2011), eta hortzak bai goiko bai beheko hortzoietan dituztenez - hausnarkariek ez bezala – kalitate handiko belar motzenetara heltzen dira (Fleurance et al., 2016). Honek guztiak ekidoen moldatzea ahalbidetzen du janari eskasia dagoen egoeretan ere, gero eta garrantzitsuagoa dena, esaterako, desertifikazio-arriskuan dauden Mediterraneoko eremu elkorretan. Gainera, gai dira baita neguko egoera hotzetara moldatzeko, bai fisiologikoki, bai portaera egokituz (Brinkmann et al., 2012).

Lehen aipatu den legez, ekidoak ez dira hausnarkariak, monogastrikoak baizik. Hausnarkarien berezitasunik nagusiena errumena da: jakien (batez ere zunzdunen) hartzidura gertatzen den urdaila. Hartzidura honen produktu moduan metanoa askatzen da ingurunera – metano enterikoa deritzoguna -, eta jakina denez, berotegi-efektuko gasa da. Izan ere, metano enterikoak abeltzaintzan eta nekazaritzan sortzen den metano guztiaren %33-39a suposatzen du (Moss et al., 2000). Hau ikusita, ekidoen abeltzaintza aukera bikaintzat hartu daiteke nekazaritza- eta abeltzaintza-jatorrizko berotegi-efektuko gasen emisioa arintzeko, ekidoek ez baitute errumenik, eta, ondorioz, hauen metano igorpena oso baxua da.

Ingurumen-eraginetatik harago, larreetan bazkatzean abereek konposatu nutrizional onuragarriak asimilatzen dituzte, adibidez, gantz-azido poliasegabeak, eta horiek animalia produktuetan (esnea, haragia) islatzen dira.

Zaldiak eta astoak mendietan edota bailaretan bazkatzen egoteak ingurumenean eta produktuen kalitatean dituen onurak argi daude, baina Espainian, sektore honen egituraketak ez du maneiu sistema honen erabilpena sustatzen. 2020an, giza kontsumora bideratutako ekido ustiategien %90 baino gehiago Espainiako iparraldean zegoen (Galizia, Asturias, Kantauri, Gaztela eta Leon, Euskadi, Nafarroa eta Errioxa), baina gizentzeko ustiategien eta hiltokien %50a Katalunian, Aragoin eta Balentzian kontzentratzen dira (Espainiako Gobernua, 2021). Ikusi da iparraldean hazitako animaliak, tokiaren orografiagatik sistema estentsiboan jarduteko aukera izan dutenak, ekialdera eramaten direla gizendu eta hiltzera. Honek zera esan nahi du, hiltze aurreko gizentze prozesuan elikatze estentsiboan jasotako onurak galtzen direla, eta honekin batera, jasotako balio erantsia ere. Hau ekiditeko, garrantzizkoa da ekidoen ekoizpen estentsiboak dituen onurak argira atera, aitortu eta ekonomikoki konpentsatzea. Ekoizpenaren dibertsifikazioa, zaldi-haragiarekin batera behor esnea salduz, helburu honetaranzko lehen pausu bat izan daiteke.

Eta zein da egoera Hego Euskal Herrian? Hemen, Espainiako ekido guztien %10a hazten da (Espainiako Gobernua, 2021). Hiru ekido arraza autoktono daude Euskal Herrian: Euskal Herriko Mendiko Zaldia (1. irudia), Pottoka (zaldia) eta Enkarterriko astoa. Hauen artean, Euskal Herriko Mendiko Zaldia da gehienbat haragi ekoizpenerako erabiltzen den arraza, eta orokorrean sistema estentsibopean hazten da: mendietan udaran eta harana eta erriberetan neguan[1]. Bere konformazioagatik, esnearen ekoizpenerako abere egokia izan daiteke, baina orain arte, ez da lan horretarako inoiz bideratu. Beraz, zaldi arraza honetako produktuen dibertsifikazioa lagungarria izan daiteke bai ingurumenerako, bai despopulatzeko arriskuan dauden landa eremuetarako, baita arrazaren kontserbaziorako ere.

1. irudia. Euskal Herriko Mendiko behorrak eta moxalak Arabako larreetan bazkatzen, uda amaieran

Europako mendebaldean behor esnea oso ezaguna ez bada ere, Asiako erdialdean aspalditik kontsumitzen den ohiko produktua da, eta Mongolian, behor esne hartzitua edari tradizionaltzat hartzen dute. Behor esneak eta bere produktu hartzituak gaixotasun anitz prebenitu eta hobetzeko gaitasuna dutela sinesten da; izan ere, aipatutako herrialdeetan, tratamendu moduan erabili izan da (Jastrzębska et al., 2017). Honen ebidentzia zientifikoa oso eskasa da momentuz, baina badaude ikerketa batzuk behor esnearen potentzial immunomodulatzailea (Fotschki et al., 2016), antimikrobianoa (Zinger-Yosovich et al., 2011), diabetesaren prebenitzailea (Song et al., 2017) eta minbiziaren aurkakoa (Guri et al., 2016; Rahmat et al., 2006) frogatu dutenak. Konposaketari dagokionez, ekido esnearen profil nutrizionala oso interesgarria da giza osasunerako. Gantz portzentai oso baxua dauka hausnarkarien esnearekin alderatuta, baina gantz azido poliasegabe ehuneko altuarekin. Laktosan aberatsa da, eta kaseina proportzio baxua dauka. Ugaztunen artean, ekidoen esnea giza esnearen antzekoena da konposizioari begira (Claeys et al., 2014). Honek guztiak behor esnea kalitatezko produktu bihurtzen du.

2. Arloko egoera eta ikerketaren helburuak

Azaldutako aurrekari guztiak kontuan izanda, gure hipotesia Euskal Herrian kalitatezko behor esnearen ekoizpena posible dela da. Ikerketa honen helburu nagusia Euskal Herriko mendiko

[1] https://www.euskalabereak.eus/arrazak/?lang=eu

behor esnearen azterketa egitea da, inoiz aztertu ez den zaldi arraza baita. Horretarako, hurrengo helburu espezifikoak ezarri dira:

1) Behor esnearen ezaugarri fisiko-kimikoak ezagutzea, hau da, puntu krioskopikoa, dentsitatea eta pH-a.

2) Behor esnearen konposizio orokorra ezagutzea, hau da, gantz totala, proteinak, estraktu lehorra, errautsa eta laktosa.

3) Behor esnearen bitamina liposolubleak (A eta E bitaminak) eta kolesterola kuantifikatzea.

3. Ikerketaren muina

3.1. Materialak eta metodoak

Esnea Azazetako (Araba) ustiategi batean jaso zen. Ustiategi honetan Euskal Herriko mendiko zaldiak hazten dira, moxalen haragiaren ekoizpena helburu. Maneiu estentsibo eta ekologikoa jarraitzen dute: zaldiek, behorrek eta moxalek Arabako mendietan bazkatzen dute udaberritik udazkenera, eta neguan altuera baxuagoko eremuetara jaisten dira. Belardi eskasia dagoenean pentsu ekologikoarekin osatzen dute animalien elikadura. Ikerketa honetarako, Euskal Herriko mendiko zaldia arrazakoak diren bost behor eskuz jetzi ziren, erditu eta bizpahiru egunera. Jasotako esne guztia nahastu (5 L gutxi gorabehera), 500 mL-ko plastikozko botiletan banatu eta -20 ºC-ra izoztu zen ustiategian bertan. Ondoren, hozkailu eramangarrietan laborategira eraman, eta -80 ºC-tan kontserbatu zen analisiak egin arte. Analisiak egiteko, 500 mL-ko esne botilak hozkailuan desizoztu ziren 12 bat orduz. Esnea berrosatu eta homogeneizatu ondoren, analisi guztiak hiru aldiz errepikatu ziren.

Ezaugarri fisiko-kimikoei dagokienez, Crison GLP 21+ pH-metro bat erabili zen pH-aren neurketarako. Puntu krioskopikoa determinatzeko CryoSmart krioskopo bat erabili zen. Azkenik, dentsitatearen neurketarako, 1,015-1,040 balio-tarteko Nahita laktodentsimetro bat erabili zen, 20 ºC-tan kalibratua. Gantz totala, proteina, kaseina, estraktu lehorra eta errautsa metodo ofizialak jarraituz analizatu ziren (AOAC International, 2006; AOAC 2000.18 (33.2.27A), 991.22 (33.2.13), 998.06 (33.2.65), 990.20 (33.2.44) eta 945.46 (33.2.10) metodo ofizialak, hurrenez hurren). Proteina ez den nitrogenoa eta serumeko proteinak matematikoki kalkulatu ziren nitrogeno frakzioetatik abiatuz. Laktosaren determinaziorako kit entzimatiko komertzial bat erabili zen (K-LOLAC 04/20 Lactose Assay Kit; Megazyme, Irlanda). Bitamina liposolubleen eta kolesterolaren determinaziorako Nájera et al. (2017)-en deskribatutako metodologiak jarraitu ziren.

Datuen prozesatzea Excel (Microsoft Korp., Redmond, WA, Amerikako Estatu Batuak) softwarean egin zen.

3.2. Emaitzak

Ezaugarri fisiko-kimikoen eta konposizio orokorraren emaitzak 1. taulan jaso dira. Literatura zientifikoaren arabera, oritzaren dentsitatea esnearena baino altuagoa da, proteina edota G immunoglobulina gehiago izateagatik. Bestalde, pH balioa oso aldakorra da ikerketen artean, seguruenik proteina eta mineral edukiaren aldakortasunagatik. Izozte puntua laktosa eta mineral edukiarekin dago erlazionatuta, eta baliteke ekido esnearen izozte puntu baxua laktosa eduki altuarekin erlazionatuta egotea (Uniacke-Lowe, 2011). Hemen aztertutako esnearen dentsitatea eta izozte puntua esne helduaren[2] balio-tarteen barruan sartzen da, baina pH balio altua aurkitu da. Azken hau azaltzeko ikerketa gehiago behar dira, esaterako, azidotasun baloragarriaren edota gantz azido askeen determinazioa, baina baliteke arrazaren mendeko faktorea izatea edo mineral eduki altuarekin erlazionatuta egotea.

Konposizio orokorrari dagokionez, gure laginaren proteinen profilak eta estraktu lehor kopuruak antzekotasuna daukate literatura zientifikoan aurkitutako 48 orduko eta 7 egunetik gorako esnearen konposizioarekin. Izan ere, erditu osteko lehengo orduetan bular-jariakinaren konposizioa oso aldakorra da, eta lehenengo 24-36 orduetan esne helduaren oso antzekoa kontsideratzen da (Salimei eta Fantuz, 2012). Ikertutako esnearen bereizgarritasun nagusiak

[2] "Esne heldua" terminoak edoskitze-aldi aurreratu bateko (> 7 egun) esneari dagokio; ingelesez *"mature milk"*.

errauts eduki handia (mineralekin erlazionatuta dagoena), laktosa eduki txikia, eta batez ere, gantz eduki oso txikia dira. Errautsa eta laktosa edukiak hasierako oritzaren antzekoagoak dira, seguruenik edoskitze-aldi goiztiarreko esnea analizatzearen ondorioz. Oro har, makronutriente guztien portzentaiak behera egiten du edoskitze-aldiarekin batera, laktosarena izan ezik, horrek gora egiten baitu (Mariani et al., 2001; Markiewicz- Kęszycka et al., 2015). Hortaz, edoskitze-aldia aurrera doan heinean, errautsaren beheranzko eta laktosaren goranzko joerak espero dira. Aztertutako esnea oritzaren eta esne helduaren tartean dagoenaren beste indikatzaile bat kaseina eta serumeko proteinen proportzioa da. Oritzak serumeko proteina gehiago eta kaseina gutxiago dauzka esne helduak baino, eta ikerketa honetako esneak 48 orduko esnearen proteina proportzio antzekoa dauka (1. taula). Proteinen proportzio hau parametro garrantzitsua da, giza eta ekido esneen arteko antzekotasun nabarmena baita: hausnarkarien esnea kaseinetan aberatsa den bitartean (proteinen %80 inguru), giza eta ekidoen esnean kaseinek proteinen %50 edo gutxiago suposatzen dute (Claeys et al., 2014). Gantzari dagokionez, badaude ikerketak behor esnean %0,6 baino gutxiagoko kopurua ikusi dutenak, baina, orokorrean, edoskitze-aldiaren erdialdetik aurrera (Markiewicz-Kęszycka et al., 2015; Mariani et al., 2001). Gure lagina oritzaren eta esne helduaren bitartekoa izanik, lortutako emaitza ezohikoa da, eta etorkizunean atal honetan sakondu beharko litzateke.

1. taula. Euskal Herriko Mendiko behorren esnearen ezaugarri fisiko-kimikoak eta konposizio orokorra

Erditzetik igarotako denbora	Ikerketa hau ~ 2-3 egun	Behor oritza [a,b,d,e,f] 0-12 ordu	Behor esnea [a,b,f] ~ 48 ordu	Behor esnea [a,b,d,e,g] > 7 egun
	EZAUGARRI FISIKO-KIMIKOAK			
Puntu krioskopikoa (-ºC)	0,566 (0,08)	0,580-0,583	i.e.	0,506 – 0,574
Dentsitatea ($g \cdot cm^{-3}$)	1,031	1,039-1,070	i.e.	1,028-1,032
pH	7,55 (0,03)	6,34	i.e.	6,67-7,30
	KONPOSIZIO OROKORRA ($g \cdot 100\ g^{-1}$ esne)			
Gantz totala	0,20 (0,00)	0,72-3,03	2,05-2,49	0,43-1,78
Proteina	2,00 (0,01)	13,1 (2,41)	1,84 (0,50)	2,11-2,23
Kaseina	1,02 (0,00)	2,95 (0,34)	2,02 (0,26)	1,17-1,20
Kaseina (% proteina)	51,1	18,0	48,9	52,0-59,2
Serumeko proteinak	0,98 (0,01)	13,5 (2,63)	2,11 (0,61)	0,80-0,91
Serumeko proteinak (% proteina)	48,9	80,0	44,5	39,4-40,8
Proteina ez den nitrogenoa	0,04 (0,01)	0,05 (0,01)	0,04 (0,00)	0,03-0,04
Estraktu lehorra	8,01 (0,00)	12,3-26,3	11,9-12,9	9,7-11,4
Errautsa	0,62 (0,04)	0,59 (0,09)	0,53 (0,02)	0,40-0,41
Laktosa	4,78 (0,05)	2,46-5,63	6,09 (i.e.)	5,85-6,64

[a]Csapó-Kiss et al. (1995); [b]Csapó et al. (1995); [d]Markiewicz-Kęszycka et al. (2015); [e]Pecka et al. (2012); [f]Salimei et al. (2002); [g]Uniacke-Lowe et al. (2011). Bataz bestekoak eta, parentesi artean, desbiderapen estandarrak. i.e. Informazio ezezaguna.

2. taulan A eta E bitaminen eta kolesterolaren emaitzak azaltzen dira. Konposatu hauei buruzko informazio zientifikoa eskasa da behor esnean, eta askotan eduki totalak gutxiesten dira. Tokolei dagokienez (E bitamina osatzen duten isomeroen familia), normalean α-tokoferola baino ez da analizatzen. A bitaminaren kasuan, erretinol librea bakarrik kuantifikatu ohi da, eta isomero nagusia den arren, ohikoa da hau beste molekula batzuetara lotuta egotea. Batzuek saponifikazio bortitza (esterifikazio loturak apurtzeko prozesu kimikoa) aplikatzen diote laginari erretinol guztia askatzeko, baina honek erretinola degradatzeko arriskua handitzen du. Gutxiespen horiek saihesteko, ikerketa honetan tokolen zortzi isomero eta esterifikatu bat (tokoferol azetatoa), eta erretinola eta bere hiru esterifikazio (erretinil palmitatoa, erretinil propionatoa eta erretinil azetatoa) aztertu dira (2. taulan ikerlan honetan identifikatutako molekulen balioak baino ez dira aipatzen). Beste ikerketekin alderatuz, aztertutako esneak esne helduarekin antzekotasun handiagoa dauka eta E bitaminan aberatsagoa da; aldiz, A bitamina

gutxi dauka. Abereen elikadurak eragin esanguratsua dauka behor esneko bitamina liposolubleen kopuruan (Bondo eta Jensen, 2011; Danyer eta Bilal, 2020; Kuhl et al., 2012), eta belar freskoa E bitaminan (Bondo eta Jensen, 2011; Danyer eta Bilal, 2020) aberatsa denez, gure laginetako E bitamina kopuru handia jandako belarraren ondorio izan daiteke. Bestalde, ekidoek β-karotenoa (A bitaminaren aurrekaria) A bitaminara transformatzeko gaitasun mugatua daukatela uste da (Álvarez et al., 2015), eta honek aurkitutako erretinol kopuru txikia azalduko luke. A bitamina eta α-tokoferol edukiak era esanguratsuan murrizten dira oritzetik esne heldura (Kuhl et al., 2012), beraz, edoskitzaroa igaro ahala, bien kontzentrazioaren murrizketa espero da.

2. taula. Euskal Herriko Mendiko behorren esnearen bitamina liposoluble eta kolesterol edukia

Erditzetik igarotako denbora	Ikerketa hau ~ 2-3 egun	Behor oritza [a,b,g,h] 0-48 ordu	Behor esnea [a,b,d,e,f,h,i] > 7 egun	Ikerketa hau ~ 48 ordu	Behor oritza [a,b,g] 0-48 ordu	Behor esnea [a,b,d,f,i] > 7 egun
	(μg·100 g^{-1} esne)			(mg·100 g^{-1} gantz)		
α-tokoferol azetatoa	145 (2,71)	i.e.	i.e.	72,4 (1,35)	i.e.	i.e.
α-tokoferola	6,17 (0,12)	133-547	59,2-156	3,08 (0,06)	19,9-24,5	14,5-38,9
α-tokotrienola	1,34 (0,25)	i.e.	i.e.	0,67 (0,12)	i.e.	i.e.
β-tokotrienola + γ-tokoferola	0,28 (0,12)	i.e.	i.e.	0,14 (0,06)	i.e.	i.e.
E bitamina	153 (2,44) **	134 (i.e.) *	2,91-113 *	76,3 (1,22) **	4,61 (i.e.) *	9,02 (i.e.) *
Erretinil palmitatoa	2,13 (0,06)	i.e.	i.e.	1,06 (0,03)	i.e.	i.e.
Erretinola	0,44 (0,00)	i.e.	4,85-101	0,22 (0,00)	i.e.	5,00-12,3
A bitamina	2,57 (0,06) **	88 (i.e.)	34 (i.e.)	1,28 (0,03) **	3,02 (i.e.)	2,72 (i.e.)
Kolesterola	2.420 (61,1)	17.517-19.981	118-9.457	1.210 (30,6)	654-677	29,1-469

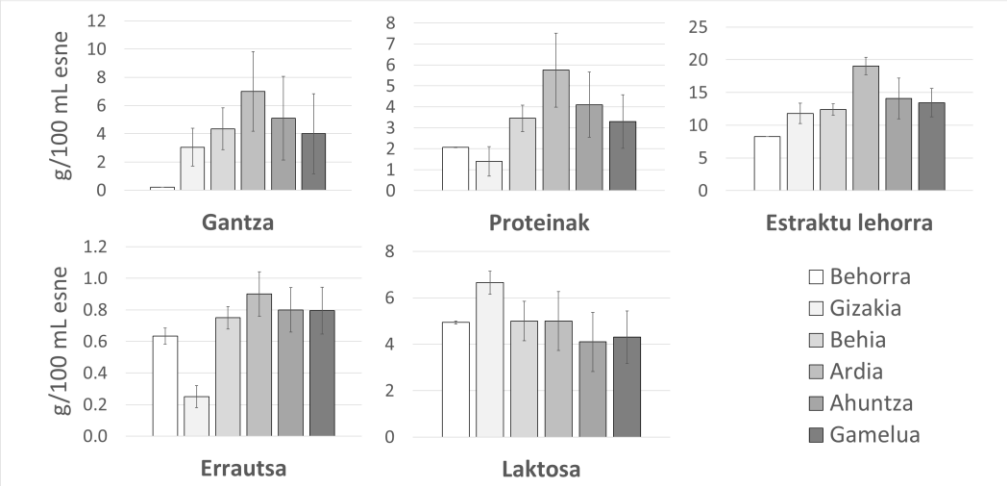
[a]Csapó et al. (1995); [b]Pikul eta Wójtowski (2008); [d]Navrátilová et al. (2018); [e]Navrátilová et al. (2019); [f] Álvarez et al. (2015); [g]Bondo eta Jensen (2011); [h]Danyer eta Bilal (2020); [i]Markiewicz- Kęszycka et al. (2014). Bataz bestekoak eta, parentesi artean, desbiderapen estandarrak. i.e. Informazio ezezaguna. * Ez du isomerorik zehazten; ** Isomeroen eta esterren batuketa

Aztertutako esnearen kolesterol edukia bat dator esne helduarenarekin, baina gantz kopuruarekiko kontsideratzen badugu, laginak oritzak baino 2 aldiz eta esne helduak baino 5 aldiz kolesterol gehiago dauka, gutxi gorabehera. Alde batetik, balio altuak topatzea esnea edoskitzaroaren hasierakoa izatearekin erlazionatuta egon daiteke. Izan ere, oritzetik esne heldura kolesterol edukiaren murrizketa esanguratsua ematen da (Pikul eta Wójtowski, 2008). Behorraren elikadurak ere eragin esanguratsua du esnearen kolesterolean (Navrátilová et al., 2018). Esaterako, estentsiboan maneiatutako behorren esnean (Pikul eta Wójtowski, 2008) kolesterol eduki altuagoak aurkitu dira intentsiboan maneiatutako behorren esnean baino (Markiewicz-Kęszycka et al., 2014; Navrátilová et al., 2018), eta linaziarekin (gantz-azido poliasegabeetan aberatsa) elikatutako behorren esnean kolesterol kopuru altuagoa topatu da (Navrátilová et al., 2018). Beraz, baliteke sistema estentsiboaren erabilera ikerketa honetako esnearen kolesterol eduki altuaren arrazoia izatea, kontuan izanda larreetako belarrak gantz-azido poliasegabeen iturri direla (Bravo-Lamas et al., 2018). Dena den, beste faktore batzuek edo hauen interakzioak eragina izan dezakete ere.

2. irudian, ikerketa honetan lortutako emaitzak beste ugaztun espezieen esnearen konposizio orokorrarekin alderatzen dira. Ikusi daitekeenez, behor esneak oso gantz gutxi, eta proteina, estraktu lehor eta errauts eskas dauzka; laktosan, ordea, beste animalia-espezieekin alderatzen da. Lehen aipatu denez, laktosaren edukia edoskitze-aldiarekin batera handituz doa, hortaz, esne helduagoak beste ugaztunen esneek baino laktosa gehiago izatea espero da. Emaitza hauek bat datoz literatura zientifikoan adierazten denarekin (Claeys et al., 2014). Ekidoen esnea giza esnearen antzekoena dela kontsideratzen da, batez ere laktosa, proteina eta errauts

kontzentrazioei dagokienez; hala ere, lehenengoak gantz gutxiago eta mineral gehiago dituela ikusi da (Claeys et al., 2014; Salimei eta Fantuz, 2012). 2. irudian ikusi daitekeenez, behor esneak giza esnearen proteina kopuru antzekoa dauka, eta errauts eduki altuagoa izan arren, beste animalia-espezieena baino baxuagoa da bai giza bai behor esnearen kasuan. Bestalde, giza esnea laktosan aberatsa da, eta, literatura zientifikoaren arabera, baita behor esnea ere (Claeys et al., 2014). Kasu honetan, ez da behor eta giza esneen arteko laktosa kopuruaren antzekotasun berezirik sumatzen, baina behor esne goiztiarrak beste animalien esneak baino laktosa kopuru bera edo handiagoa daukala ikusita, edoskitze-aldiak aurrera egin ahala giza esnearekin alderagarria izango dela aurreikusi daiteke.

2. irudia. Edoskitze-aldi goiztiarreko behor esnearen eta giza, behi, ardi, ahuntz eta gamelu esneen konposizio orokorraren konparaketa



Giza, behi, ardi, ahuntz eta gamelu esneen datuen iturria: Claeys et al. (2014). Bataz bestekoak eta desbiderapen estandarrak.

4. Ondorioak

Ikerketa honetan, edoskitze-aldi goiztiarreko behor esnea aztertu da. Lagin kopuru txikia aztertu den arren, bere ezaugarri fisiko-kimikoak eta konposizio orokorra bat datoz beste ikertzaileek aztertutako behor esne helduarekin, nahiz eta parametro batzuek – batez ere laktosa eta errauts edukiek eta proteina profilak – oritzaren eta esne helduaren arteko trantsizioan kokatu gure lagina. Ikerketa honetako esnearen berezitasun nabarmenenak gantz kopuru oso txikia eta errauts kopuru handia dira. E bitaminan aberatsa da, dietaren ondorio izan litekeena, eta A bitaminan pobrea da, beharbada zaldiek A bitaminaren aitzindariak metabolizatzeko gaitasun txikia dutelako. Guk dakigula, bitaminen isomero hauek behor esnean aztertu diren lehenengo aldia da. Gantz frakzioan, kolesterol kopuru oso altuak ikusi dira. Dena den, behor esnearen kolesterol ekarpena txikia da gantz maila baxuen ondorioz. Orokorrean, ikertutako esneak hausnarkarien esneak baino antzekotasun handiagoa dauka giza esnearekin, literatura zientifikoak azaltzen duen bezala.

Honekin batera, Euskal Herriko Mendiko Zaldiak kalitatezko esnea eman dezakeela frogatu da, eta honek zera esan nahi du, behor esnearen ekoizpena dibertsifikaziorako aukera ona izan daitekeela, ekidoen sektorearen balioa handituz, landa-eremuak sustatuz eta artzaintzaren ingurunerako onurak sendotuz. Gainera, ekidoen ekoizpen estentsiboak dituen onurak argira atera, aitortu eta ekonomikoki balioesteko lagungarria izan daiteke ikerketa hau.

5. Etorkizunerako planteatzen den norabidea

Lortutako emaitzak aztertuta, interesgarria izango litzateke zaldi arraza honetako behorren esnea sakontasunez ikertzea. Horretarako, diseinu esperimental bat prestatu da, non edoskitze-aldi osoan zehar (apiriletik urrira; hau da, erditzetik sei hilabete igaro arte) laginak hartuko diren, astero lehenengo hiruhilekoan eta hamabost egunero bigarren hiruhilekoan. Ustiategien

arteko aldakortasuna kontuan hartzeko, hiru ustiategi ezberdinetatik hartuko dira laginak, eta bakoitzean 6 behorrek hartuko dute parte esperimentuan (18 behor). Helburu nagusia esnearen makro- eta mikronutriente ezberdinen aldakortasuna edoskitzaro osan zehar aztertzea da, baita faktore ezberdinen (abeltegia, maneiu sistema, behorra, etab.) eragina ikertzea ere.

6. Erreferentziak

Álvarez, R., Meléndez-Martínez, A. J., Vicario, I. M. eta Alcalde, M. J. (2015). Carotenoids and fat-soluble vitamins in horse tissues: a comparison with cattle, *Animal*, 9(7), 1230-1238.

AOAC. (2006): *Official Methods of Analysis*, Association of Official Analytical Chemists, Gaithersburgs, MD, Amerikako Estatu Batuak.

Bondo, T. eta Jensen, S. K. (2011). Administration of RRR-α-tocopherol to pregnant mares stimulates maternal IgG and IgM production in colostrum and enhances vitamin E and IgM status in foals, *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 95, 214-222.

Bravo-Lamas, L., Aldai, N., Kramer, J. K. G. eta Barron L. J. R. (2018). Case study using comercial dairy sheep flocks: Comparison of the fat nutritional quality of milk produced in mountain and valley farms, *LWT – Food Science and Technology*, 89, 374-380.

Brinkmann, L., Gerken, M. eta Riek, A. (2012). Adaptation strategies to seasonal changes in environmental conditions of a domesticated horse breed, the Shetland pony (*Equus ferus caballus*), *Journal of Experimental Biology*, 215(7), 1061-1068.

Celaya, R., Ferreira, L., García, U., García, R. R. eta Osoro, K. (2011). Diet selection and performance of cattle and horses grazing in heathlands, *Animal: An International Journal of Animal Bioscience*, 5(9), 1467-1473.

Claeys, W. L., Verraes, C., Cardoen, S., De Block, J., Huyghebaert, A., Raes, K., Dewettinck, K. eta Herman, L. (2014). Consumption of raw or heated milk from different species: An evaluation of the nutritional and potential health benefits, *Food Control*, 42, 188-201.

Csapó, J., Stefler, J., Martin, T. G., Makray, S. eta Csapó-Kiss, Zs. (1995). Composition of mares' colostrum and milk. Fat content, fatty acid composition and vitamin C content, *International Dairy Journal*, 5, 393-402.

Csapó-Kiss, Zs., Stefler, J., Martin, T. G., Makray, S. eta Csapó, J. (1995). Composition of mares' colostrum and milk. Protein content, amino acid composition and contents of macro- and micro-elements, *International Dairy Journal*, 5, 403-415.

Danyer, E. eta Bilal, T. (2020). Effects of dietary fish oil and alpha-tocopherol supplementation on selected blood parameters and fatty acid profiles in mares and their foals, *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 1-15.

Espainiako Gobernua (2021): *Informe del Sistema Integral de Trazabilidad Animal (SITRAN)*. [https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/trazabilidad-animal/registro/default.aspx].

Fleurance, G., Farruggia, A., Lanore, L. eta Dumont, B. (2016). How does stocking rate influence horse behaviour, performances and pasture biodiversity in mesophile grasslands?, *Agriculture, Ecosystems eta Environment*, 231, 255-263.

Fotschki, J., Szyc, A. M., Laparra, J. M., Markiewicz, L. H. eta Wróblewska, B. (2016). Immune-modulating properties of horse milk administered to mice sensitized to cow milk, *Journal of Dairy Science*, 99(12), 9395-9404.

Futa, B., Patkowski, K., Bielińska, E. J., Gruszecki, T. M., Pluta, M., Kulik, M. eta Chmielewski, S. (2017). Sheep and horse grazing in a large-scale protection area and its positive impact on chemical and biological soil properties, *Polish Journal of Soil Science*, 49(2), 111.

Guri, A., Paligot, M., Crèvecoeur, S., Piedboeuf, B., Claes, J., Daube, G., Corredig, M., Griffiths, M. W. eta Delcenserie, V. (2016). In vitro screening of mare's milk antimicrobial effect and antiproliverative activity, *FEMS Microbiology Letters*, 363(2).

Jastrzębska, E., Wadas, E., Daszkiewicz, T. eta Pietrzak-Fiećko, R. (2017). Nutritional value and health-promoting properties of mare's milk− a review, *Czech Journal of Animal Science*, 62(12), 511-518.

Kuhl, J., Aurich, J. E., Wulf, M., Hurtienne, A., Schweigert, F. J. eta Aurich, C. (2012). Effects of oral supplementation with β-carotene on concentrations of β-carotene, vitamin A and α-tocopherol in plasma, colostrum and milk of mares and plasma of their foals and on fertility in mares, *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 96(3), 376-384.

Mariani, P., Summer, A., Martuzzi, F., Formaggioni, P., Sabbioni, A. eta Catalano, A. L. (2001). Physicochemical properties, gross composition, energy value and nitrogen fractions of haflinger nursing mare milk throughout 6 lactation months, *Animal Research,* 50(5), 415-425.

Markiewicz-Kęszycka, M., Wójtowski, J., Czyżak-Runowska, G., Kuczyńska, B., Puppel, K., Krzyżewski, J., Strzałkowska, N., Jóźwik, A. eta Bagnicka, E. (2014). Concentration of selected fatty acids, fat-soluble vitamins and β-carotene in late lactation mares' milk, *International Dairy Journal,* 38(1), 31-36.

Markiewicz-Kęszycka, M., Czyżak-Runowska, G., Wójtowski, J., Jóźwik, A., Pankiewicz, R., Łęska, B., Krzyżewski, J., Strzałkowska, N., Marchewka, J. eta Bagnicka, E. (2015). Influence of stage of lactation and year season on composition of mares' colostrum and milk and method and time of stogare on vitamin C content in mares' milk, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 95, 2279-2286.

Moss, A. R., Jouany, J. eta Newbold, J. (2000). (2000). Methane production by ruminants: Its contribution to global warming, *Annales De Zootechnie,* 49(3), 231-253.

Nájera, A. I., Bustamante, M. A., Albisu, M., Valdivielso, I., Amores, G., Mandaluniz, N., Arranz, J., Barron, L. J. R. eta de Renobales, M. (2017). Fatty acids, vitamins and colesterol content, and sensory properties of cheese made with milk from sheep fed rapeseed oilcake, *Journal of Dairy Science*, 100(9), 6962-6971.

Navrátilová, P., Pospíšil, J., Borkovcová, I., Kaniová, L., Dluhošová, S. eta Horáková, S. (2018). Content of nutritionally important components in mare milk fat, *Mljekarstvo: Časopis Za Unaprjeđenje Proizvodnje i Prerade Mlijeka,* 68(4), 282-294.

Navrátilová, P., Borkovcová, I., Kaniová, L., Dluhošová, S. eta Zachovalová, H. (2019). The content of selected vitamins and iodine in mare's milk, *Acta Veterinaria Brno*, 88, 473-480.

Pecka, E., Dobrzański, Z., Zachwieja, A., Szulc, T. eta Czyz, K. (2012). Studies of composition and major protein level in milk and colostrum of mares, *Animal Science Journal*, 83, 162-168.

Pikul, J. eta Wójtowski, J. (2008). Fat and cholesterol content and fatty acid composition of mares' colostrums and milk during five lactation months, *Livestock Science*, 113(2-3), 285-290.

Rahmat, A., Rosli, R., Hoon, T. M., Umar-Tsafe, N., Ali, A. M. eta Bakar, M. F. A. (2006). Comparative evaluation of cytotoxic effects of milk from various species on leukemia cell lines, *Malaysian Journal of Medicine and Health Sciences,* 2(1), 1-10.

Rigueiro-Rodríguez, A., Mouhbi, R., Santiago-Freijanes, J. J., Gonzalez-Hernandez, M. d. P. eta Mosquera-Losada, M. R. (2012). Horse grazing systems: Understory biomass and plant biodiversity of a pinus radiata stand, *Scientia Agricola,* 69(1), 38-46.

Ringmark, S., Skarin, A. eta Jansson, A. (2019). Impact of year-round grazing by horses on pasture nutrient dynamics and the correlation with pasture nutrient content and fecal nutrient composition, *Animals,* 9(8), 500.

Salimei, E., Varisco, G. eta Rosi, F. (2002). Major constituents, leptin, and non-protein nitrogen compounds in mares' colostrum and milk, *Reproduction, Nutrition, Development*, 42, 65-72.

Salimei, E. eta Fantuz, F. (2012). Equid milk for human consumption, *International Dairy Journal,* 24(2), 130-142.

Song, J. J., Wang, Q., Du, M., Ji, X. M. eta Mao, X. Y. (2017). Identification of dipeptidyl peptidase-IV inhibitory peptides from mare whey protein hydrolysates, *Journal of Dairy Science,* 100(9), 6885-6894.

Uniacke-Lowe, T. (2011): *Studies on equine milk and comparative studies on equine and bovine milk systems*, Doktorego Tesia, University College Cork, Irlanda.

Zinger-Yosovich, K. D., Sudakevitz, D., Iluz, D. eta Gilboa-Garber, N. (2011). Analyses of diverse mammals' milk and lactoferrin glycans using five pathogenic bacterial lectins, *Food Chemistry,* 124(4), 1335-1342.

7. Eskerrak eta oharrak

Autoreak eskerrak eman nahi dizkio Eusko Jaurlaritzako Hezkuntza Sailari Doktore ez diren ikertzaileak prestatzeko Doktoratu Aurreko Programako laguntzagatik. Ikerlan hau Lactiker ikerkuntza taldearen barruan aurrera eramaten ari den doktorego-tesi baten parte da (Farmazia eta Elikadura Zientzien Saila, Farmazia Fakultatea, Euskal Herriko Unibertsitatea). Lactiker Euskal Unibertsitate Sistemako Ikerketa Talde Finkatua da (IT944-16).

Arazketa lohietatik eratorritako balio erantsi altuko ongarri seguruen ekoizpena

Guerra, N., Puyuelo, B. eta Ponsá, S.
Centro Tecnológico BETA – Vic eko Unibertsitatea. nagore.guerra@uvic.cat

Laburpena

Populazioaren eta haien janari eskariaren igoera dela eta, nekazaritza-produkziorako egoki diren ongarrien beharra, bai kantitate zein kalitate aldetik, Europa mailako erronka nagusietako bat da gaur egun. Testuinguru honetan, karbono eta nutrienteen, eta bereziki fosforoaren, berreskuratzea ahalbidetzen duten innobazio teknologikoek lehentasun handia dute, ez soilik haien beharragatik, bai eta europarentzat etorkizuneko bio-ekonomiarantzko bidean aitzindari izateko aukera izan daitekeelako.

Horren haritik, era egokian tratatu ezkero, araztegi lohiak aipatutako baliabideen iturri gisa ustiatu litezke. Izan ere, sortzen diren araztegi lohi mota desberdinen artean ezaugarri egokiak dituzten lohiak hautatuz kalitate altuko ongarri seguruak ekoitz daitezke. Adibidez, fosforoa biologikoki ezabatu eta pilatzeko gaitasuna duen prozesua den SCENA (*Short Cut Enhanced Nutrient Abatement*) prozesua konpostatze prozesu aurreratuarekin konbinatuz, kalitate altuko bio-ongarri segurua produzitu daiteke. Premisa hau baieztatzera daramaten lortutako emaitzak honakoak dira: i) nutriente kontzentrazioa (N > 3%, P > 4% eta K > 1%, gai lehorrean neurtuta), ii) produktuaren egonkortasuna (Arnasketa Indize Dinamikoa < 1 gO_2 $kgSV^{-1}h^{-1}$ eta 4 eguneko oxigeno kontsumo metatua < 60 gO_2 $kgSV^{-1}$), iii) metal astun edukia, 506/2013 Errege Dekretuaren arabera B klasean kategorizatzea baimentzen duelarik eta lehengai gisa erabilitako lohiekin alderatuz, kezka sortzen duten kutsagarrien murriztea (pestizida eta antibiotikoak), iv) nekazaritzari lotutako kalitate aspektuak, esate baterako, iturri mineralen mailan dagoen fosforo iturri efizientea dela egiaztatzea.

Hitz gakoak: arazketa lohia, fosforoa, konpostatze aurreratua, bio-ongarria.

Abstract

The continuous population growth and their concomitant feeding requirements, the need of appropriate fertilizing products for their use in agriculture, in terms of quantity and quality, is presented as a key challenge at European level. In this context, the development of technologies aiming the maximum organic carbon and nutrients recovery, and particularly phosphorus, from renewable sources to return them to soils is currently a priority, being not only a need but also an opportunity.

In this sense, sewage sludges are recognized to be a significant source or the resources abovementioned provided that they are properly treated. From the wide range and typology of sewage sludges produced, the appropriate selection of the sludges to be used according to their characteristics can lead to the production of high-quality fertilizers. The coupling of the biological phosphorus removal and cumulation process known as SCENA (Short Cut Enhanced Nutrient Abatement) with the advanced dynamic composting process allows the production of a safe high-quality product, demonstrated by means of: i) nutrients concentration (N >3% TS, P > 4% TS, K > 1%TS), ii) high stability of end product (DRI < 1 gO_2 $kgSV^{-1}h^{-1}$ and AT4 < 60 gO_2 $kgSV^{-1}$),iii) heavy metals content categorizing the product as a class B compost according to RD 506/2013 and reduction of the content of contaminants of emerging concern (pesticides and antibiotics) compared to the sludge fed and, iv) agricultural quality demonstrated by means of its efficiency as phosphorus source in plants, equivalent to mineral sources.

Keywords: sludge, phosphorus, advanced composting, biofertilizer

1. Sarrera eta motibazioa (Formatu orokorra eta bibliografia)

Munduko populazioaren igoerak ezinbestean nekazaritza elika-katearen igoera eta beraz, ongarrien demandaren igoera dakar. Betidanik, nekazaritzan gehien erabili diren ongarriak iturri mineralekoak izan dira, beste arrazoi batzuen artean nekazaritza lurren karbono galera eraginez. Bestalde, nekazaritza lurretan aplikatzen diren nutrienteen artean, fosforoak, bere iturri mugatua eta prezio igoera (1,18-2,29€·kg^{-1} P) direla eta, kezka handia sortzen du (Raheem et al., 2018). Europar testuinguruan, fosforo mineralaren, hots, arroka fosforikoaren, inportazioaren ezinbesteko dependentzia dela eta, arroka

fosforikoa lehengai kritikoen zerrendan sartu zen 2014ean (Europako Batzordea, 2014). Ondorioz, Europako Itun Berdearen baitan, fosforoaren berreskuratzea lehentasunetako bat da, horretarako fosforo maila altuak izan ditzaketen hondakinetatik fosforo hori berreskuratzea ahalbidetzen duten innobazio teknologikoen aldeko apustua egiten ari delarik.

Arazketa urak fosforo iturri berriztagarrien adibide dira, izan ere nekazaritzarako fosforo eskariaren %15-20 asetzeko gai izango lirateke (Yuan et al., 2012). Ur zikinen arazketa prozesuan sortzen diren lohiek fosforoa eta beste makro-eta mikro- nutrienteak pilatzeko joera dute. Hau jakinik, haien nekazaritzarako erabilera positiboki hartzen da betiere haien metal astunen edukia 86/278/CEE Europar Zuzentarauak (Europar Batzordea, 1986) mugatzen dituen baloreen azpitik baldin badago. Era egokian kudeatu ostean, arazketa lohien erabileraren bitartez nekazaritza lurrek karbonoa eta nutrienteak berreskura ditzakete, haien erabilera segurua bermatu badaiteke behintzat. Ekoizten diren lohi guztiak ez dira egokiak izaten haien ezaugarri eta konposatu kutsagarrien edukiak direla eta. Horren haritik, arazketa lohien ezaugarrien heterogeneotasunagatik, lohiak ez dira ongarriak ekoizteko lehengaien zerrendan onartu Europako ongarrien araudian (2019/1009 ongarrien merkatua arautzen duen araudia). Haatik, ezaugarri egoki eta seguruak dituzten lohiak hautatuz edo horiek ekoiztea ahalbidetzen duten soluzio teknologikoak hautatuaz aipatutako ahultasun horiek gainditu daitezke.

Ildo honetatik, fosforoa biologikoki ezabatu eta pilatzeko gaitasuna duen SCENA (*Short Cut Enhanced Nutrient Abatement*) prozesuak nitrogeno eta fosforo kontzentrazio oso altua duten lohien deshidratazioan berreskuratutako urak tratatzen ditu (Longo et al., 2017). Prozesu honetan nutriente eduki altua duten eta metal astunetan urriak diren lohiak ekoizten dira, zeinak era egokian kudeatuz gero ongarri gisa potentzial handia izan dezaketen. Bestalde, arazketa lohien konpostatze prozesu dinamiko aurreratua gai da produktu higienizatu eta egonkorra sortzeko, zeina nekazaritza lurren propietate fisiko-kimiko eta mikrobiologikoak hobetzeko gai den (Grigatti et al., 2019). Horretaz gain, konpostatze prozesuak kezka sortzen duten konposatu kutsakor berriak, esaterako, farmako eta pestizidak, biodegradatzeko potentziala du (Ezzariai et al., 2018; Zhang et al., 2019). Aipatutako teknologia hauen konbinazioak potentziala dauka segurua den kalitate altuko bio-ongarria ekoizteko, ongarri mineralekin lehiatzeko gaitasuna izan dezakeena.

2. Arloko egoera eta ikerketaren helburuak

Ikerketa honen helburu nagusia arazketa lohi egokiak lehengaitzat hartuz kalitatezko bio-ongarri seguruak sor daitezkeela frogatzea da. Kasu honetan, SCENA prozesua eta konpostatze prozesu aurreratuaren akoplamenduan sortzen den produktuan eta maila desberdinetan:

- Produktuaren parametro fisiko-kimiko eta biologikoak.
- Konposatu kutsakorren edukia neurtzea: metal astunak eta kezka sortarazten duten konposatu kutsakor berriak.
- Produktuaren nekazaritza kalitatea

3. Ikerketaren muina

3.1. Konpostatze prozesua eta ekoiztutako produktuen kalitatea

Guztira 3 konpostatze prozesu burutu dira ezaugarri antzekoak zituzten fosforodun lohiekin (1.taula). Prozesua ondo burutu dadin, lohiak lehenik eta behin xehatutako kimatze hondakinekin nahastu dira nahastearen estruktura egokia bermatzeko, bere hezetasuna %60 inguruan doituz. Arnasketa Indize Dinamikoaren (AID) eta 4 eguneko oxigeno kontsumo metatuaren arabera (AT4), lohi hauen biodegradagarritasuna ertaina da (Barrena et al., 2011), materialaren autoberotze gaitasunean oinarritutako prozesu aerobioentzat egokia dena, alegia.

Konpostatze prozesuak hermetikoki itxitako eta termikoki isolatutako erreaktore biologiko baten barnean egin dira (100L). Konpresore bat erabiliz eta kontroladore masiko baten bitartez, erreaktorea azpialdetik airez hornitu da. Airearen kontrola egiteko algoritmo automatiko bat garatu da Puyuelo et al. (2010)-ek egindako lanean oinarrituz. Kontrol sistema hau hornitutako aire maila komunitate mikrobiologikoaren oxigenoaren kontsumo abiaduraren arabera egokitzeko gai da. Konpostatze prozesu guztiek degradazio aktibo fase bat (20 egun) eta aireztapen aktiborik gabeko ontze fase bat (60-70 egun) izan dute.

Konpostatze prozesu guztiak era egokian burutu dira, beti 5 eta 7 egun arteko fase termofiloa izan dutelarik. Oxigeno eskari biologikoan oinarritzen den prozesuaren kontrol sistema berritzaile honek prozesu biologikoak optimizatzea ahalbidetu du, prozesua gehienez hiru hilabetetan amaituz. Ekoiztutako produktu guztiak biologikoki egonkorrak dira neurtutako arnasketa indizeen arabera (AID < 1g O_2 $kg^{-1}SVh^{-1}$ y AT4 < 50g O_2 $kg^{-1}SV$) (Adani et al., 2003). Bestalde, beraien ezaugarri fisiko-kimikoei dagokienez (1.taula), produktuak materia organiko maila altua dute (beti produktuaren gai lehorraren %50 baino gehiago), bai eta nutriente edukiak, gai lehorraren %3ko nitrogeno eta %2,6ko fosforo edukiak lortu dituztelarik.

1. taula. Lohi eta bio-ongarrien ezaugarri fisiko-kimiko eta biologikoak

Parametroa	Arazketa lohiak	Lortutako bio-ongarriak
Gai lehorra (%, ghn)	17-19	61-92
Materia organikoa (%, gln)	72- 75	58-65
KNT (%, gln)	6,0- 8,1	3,4-4,2
C/N	5,0-5,7	
Fosforoa (%FT, gln)	3,0-4,2	2,2-2,6
Potasioa (%KT, gln)	0,3-0,6	0,6-1,3
pH	8,0-8,3	5,8-6,6
Eroankortasun elektrikoa (mS/cm)	0,7-0,9	2,8-8,2
AID 24h max (mg O_2/g VS h)	2,5- 4,5	0,4-0,9
AT_4(mgO_2/g VS)	157-243	35-58

ghn, gai hezean neurtuta. gln, gai lehorrean neurtuta, KNT Kjeldahl Nitrogeno Totala, AID Arnasketa Indize Dinamikoa, AT4 4 egunetan metatutako arnasketa

Literaturan topatutako lohi arrunten edota animalia gorotzen konpostaren fosforo edukiekin alderatuz (gai lehorraren %0,9-2,2 eta %0,6-1 lohi arrunten eta animalia gorotzen konpostetan, hurrenez hurren), lan honetan ekoiztutako bio-ongarriaren fosforo maila nabarmenki altuagoa da (Grigatti et al., 2019). Beraz, badirudi ekoiztutako produktuen eduki nutritiboaren arabera bio-ongarri onek potentziala izan dezakeela ongarrien merkatuan.

Lortutako produktuen erabilera segurua frogatzeko produktu guztien adierazgarritzat hartu den produktuetako batean konposatu kutsakor desberdinak neurtu dira. Neurtutako kutsakorren artean legedian arautzen diten metal astunak eta kezka sortarazten duten kutsakor berriak, esaterako, pestizida, antibiotiko eta higiene pertsonalerako produktuak neurtu dira. Zehazki, Europako behatutako kutsakorren zerrenda barruan (Batzordearen Erabakia 2018/840, EU, 2018) dauden kutsakorrak neurtu dira. Bestalde, konpostatze prozesuak konposatu kutsakor hauengan izan dezakeen biodegradazio ahalmena ebaluatu ahal izateko, konposatuak hasierako lohietan ere neurtu dira.

Ekoiztutako bio-ongarrien metal astun edukia 2.taulan agertzen da, horretaz gain, alderaketa egin ahal izateko garrantzia duten legedi desberdinetan ongarrietan onartzen diren metal astun edukiak ere zehaztu dira. Neurtutako metal astunen arabera, ekoiztutako bio-ongarria kalitate altukoa dela esan liteke, izan ere Zink edukia besterik ez da maila gorenenean sailkatu ezin izatearen arrazoia (Ongarriei buruzko Errege Dekretua 507/2013).

Nahiz eta hidrokarburo aromatiko poliziklikoak (HAPak) eta kloroalkanoak hasierako lohian antzeman diren, bio-ongarrian ez dira ageri, konpostatze prozesuak mota honetako konposatu kutsakorrengan izan dezakeen biodegradazio efektuaren hipotesia indartuz (Guo et al. 2020). Imidacloprid pestizidak kontrako joera erakusten du, ordea. Izan ere bio-ongarrian besterik ez da antzeman konposatu hau, konpostatze prozesuaren bidezko kontzentrazio efektua erakutsiz. Hala ere, konposatu honen erabilera zabala jakinik, baliteke konposatuaren benetako iturria kimatze hondakinetan egotea eta ez lohian, baina kimatze hondakinetan neurketarik egin ez denez, hipotesi hau ezin da frogatu.

Azkenik, Europako behatutako kutsakorren zerrendan agertzen diren konposatuetatik 3 bakarrik agertu dira bio-ongarrian: claritromizina, azitromizina eta ciprofloxazina. Hala ere, lohian neurtutako mailekin alderatuz, badirudi konpostatze prozesua gai dela konposatu hauek %30-60 inguru murrizteko. Bestalde, bio-ongarrian ez da estrogenorik antzeman, baina bai hasierako lohian. Emaitza hauek literaturan topatu diren emaitzekin bat datoz, izan ere konpostatze prozesua antibiotiko batzuen (tetraziklinak, sulfonamidak eta makrolidoak, esaterako) edukia %70-99 murrizteko gai dela frogatu da (Ezzariai et al., 2018; Zhang et al., 2019).

2. taula. Bio-ongarriaren metal astunen edukia legedi desberdinetan araututako maila maximoekin alderatuz (mg/kg gai lehorrean neurtuta)

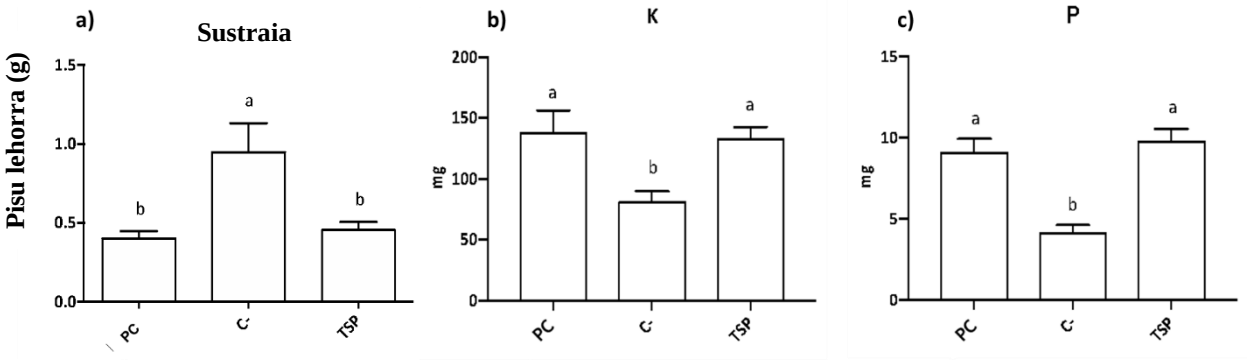
Metal astuna	Ekoiztutako bio-ongarria	*End of waste criteria on biodegradable waste subject to biological treatment*	Ongarri organikoa (FPC1) (Ongarrien araudi europarra 2019/1009)	A mailako konposta (506/2013 Errege Dekretua)	B mailako konposta (506/2013 Errege Dekretua)
Cr	24,4 ± 1,4	100		70	250
Ni	16,0 ± 0,9	50	50	25	90
Cu	63,2 ± 1,2	200	300	70	300
Zn	290 ± 3	600	800	**200**	500
Cd	0,32 ± 0,01	1,5	1,5	0,7	2
Pb	15,8 ± 0,4	120	120	45	150
Hg	0,482 ± 0.231	1	1	**0,4**	1,5

3.2. Ekoiztutako bio-ongarriaren bioentsegua arto landareetan

Azkenik, produktuaren erabilera eraginkorra balioztatzeko, lorontzi (4.5L) bidezko bioentsegu bat burutu da arto landareekin. Lorontzi bakoitzean 25mg fosforo baliokide izateko haina produktu jarri dira lur kilogramo bakoitzeko (Perelli, 2009). Kontrol negatibo (c-) eta positiboak (Super Fosfato Hirukoitza edo TSP) gehitu dira ongarriaren efektua landarearen hazkuntzarengan, egoera nutrizionalarengan eta aplikatutako fosforoaren erabilera eraginkorrarengan ikertzeko. Tratamendu talde bakoitzeko 5 erreplika jarri dira non 2 egunez hozitutako arto haziak (hybrid P0943, Pioneer) landatu diren. Lorontziak kontrolatutako tenperatura (37ºC egunez eta 27ºC gauez, batezbeste), hezetasun erlatiboa (45%) eta argiztapena (16/8 orduko fotoperiodoa, argi/ilun) daukan negutegi batean jarri dira 8 astez.

Lortutako emaitza esangarrienak laburbilduz, bio-ongarria gehitu zaien landareen hazkundeari lotutako parametroak kontrol positiboarekiko baliokideak izan dira (1.a irudia). Kontrol negatibo tratamendua izan duten landareen sustraien garapen esanguratsua, tratamendu horretan gerta daitekeen fosforo gabeziari lotuta egon daiteke (Hawkesford et al., 2012), ekoiztutako bio-ongarriek ongarri mineralekiko (TSP) baliokide den fosforo erabilera eraginkorra dutela frogatuz.

1. irudia. Sustraien pisu lehorra (a), eta tratamendu desberdinen bitartez landareek metatutako potasio (b) eta fosforo (c) kantitateak: Ekoiztutako bio-ongarria (PC), Kontrol negatibo (C-) eta positiboa (TSP). Datuak batezbeste ± desbiderazio estandarraren (n=5) arabera adierazi dira, esangarritasun estatistikoa hizkiekin adierazi delarik (alde bakarreko Anova, Tuckey post-hoc analisi bidez, p < 0.05).



Azkenik, bio-ongarri esperimentalak azaldu duen TSP kontrol positiboarekin lortutako fosforo eta potasio metaketa baliokideek (1b eta c irudiak, hurrenez-hurren), ekoiztutako bio-ongarriaren nutriente hauen erabilera efektiboa frogatzen du landarearen baitan.

4. Konklusioak

Kalitate altuko lehengaiak, eta kasu honetan arazketa lohiak, sortzea ahalbidetzen duten soluzio teknologikoek balio erantsi altuko ongarriak sortzeko aukera sortzen dute. Fosforoa biologikoki metatzeko gaitasuna duen SCENA prozesuaren eta konpostatze dinamiko aurreratuaren konbinazioak materia organiko eta nutriente eduki altuko eta metal astun eduki baxuko bio-ongarri egonkorra sortzea ahalbidetu du. Arto landarearekin egindako nekazaritza- testei dagokienez, lortutako bio-ongarria ongarri mineralekiko (TSP) baliokidea da landarearen hazkunde eta nutrienteen (fosforo eta potasio) xurgatze eta erabilerari dagokienez. Horretaz gain, konpostatze dinamiko aurreratua kutsakor berrien edukia murrizteko gai dela frogatu da, esaterako HAPak, kloroalkanoak eta antibiotiko eta farmako sorta zabal bat. Hortaz, aipatutako bi innobazio teknologikoen konbinazioak ongarri mineralekin alderatu daitekeen ongarri organiko segurua ekoiztea ahalbidetzen du, zeinak Europako ongarrien merkatuan dauden ongarriak partzialki ordezkatzeko potentziala izan dezakeen.

5. Etorkizunerako planteatzen den norabidea

Konpostatze aurreratuaren bidez arazketa lohien berrerabilpen segurua bermatzea da gaur egungo erronketako bat arlo honetan. Nahiz eta 2019/1009 ongarrien araudiaren lehengaien zerrendan arazketa lohiak ez dauden onartuta, lan honetan lortutako emaitza positiboek agerian uzten dute soluzio teknologiko egokiak hautatu ezkero posible dela kalitate altuko produktu seguru bat ekoiztea. Ildo honetan jarraitu ezkero, ongarri mineralak era jasangarri eta seguruan partzialki ordezkatzeko gaitasuna izan dezake Europak.

6. Erreferentziak

Adani, F., Gigliotti, G., Valentini, F., & Laraia, R. (2003). Respiration index determination: a comparative study of different methods. Compost science & utilization, 11(2), 144-151.

Barrena, R., Gea, T., Ponsá, S., Ruggieri, L., Artola, A., Font, X., eta Sánchez, A. (2011). Categorizing raw organic material biodegradability via respiration activity measurement: a review. Compost Science & Utilization, 19(2), 105-113.

European Commission, Implementing Decision (EU) 2018/840 of 5 June 2018 establishing a watch list of substances for Union-Wide monitoring in the field of water policy pursuant to Directive 2008/105/EC of the European Parliament and of the Council and repealing Commission IMPL, Off. J. Eur. Union. 61 (2018) 9–12.

Ezzariai, A., Hafidi, M., Khadra, A., Aemig, Q., El Fels, L., Barret, M., ... eta Pinelli, E. (2018). Human and veterinary antibiotics during composting of sludge or manure: Global perspectives on persistence, degradation, and resistance genes. Journal of hazardous materials, 359, 465-481.

Grigatti, M., Cavani, L., di Biase, G., eta Ciavatta, C. (2019). Current and residual phosphorous availability from compost in a ryegrass pot test. Science of The Total Environment, 677, 250-262.

Guo, Y., Rene, E. R., Wang, J., eta Ma, W. (2020). Biodegradation of polyaromatic hydrocarbons and the influence of environmental factors during the co-composting of sewage sludge and green forest waste. Bioresource technology, 297, 122434.

Hawkesford, M., Horst, W., Kichey, T., Lambers, H., Schjoerring, J., Møller, I.S. eta White, P. 2012. Chapter 6 - Functions of Macronutrients, in: Marschner, P., (ed.) Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants, San Diego: Accademic Press, pp. 135-189.

Longo, S., Frison, N., Renzi, D., Fatone, F., eta Hospido, A. (2017). Is SCENA a good approach for side-stream integrated treatment from an environmental and economic point of view?. Water research, 125, 478-489.

Perelli, M., Graziano, P.L. eta Calzavara, R., 2009. Nutrire le piante. Arvan Editore, Venezia.

Puyuelo, B., Gea, T., eta Sánchez, A. (2010). A new control strategy for the composting process based on the oxygen uptake rate. Chemical Engineering Journal, 165(1), 161-169.

Raheem, A., Sikarwar, V. S., He, J., Dastyar, W., Dionysiou, D. D., Wang, W., eta Zhao, M. (2018). Opportunities and challenges in sustainable treatment and resource reuse of sewage sludge: a review. Chemical Engineering Journal, 337, 616-641.

Real Decreto 506/2013, de 28 de junio, sobre productos fertilizantes. Boletin Oficial del estado, 28 de junio de 2013, núm 164, pp. 51119-51207.

Reglamento (UE) 2019/1009, de 5 de junio, por el que se establecen disposiciones relativas a la puesta a disposición en el mercado de los productos fertilizantes UE y se modifican los Reglamentos (CE) n.o 1069/2009 y (CE) n.o 1107/2009 y se deroga el Reglamento (CE) n.o 2003/2003, Diario Oficial de la Unión Europea, 25 de junio de 2019, núm L 170, pp. 1–114.

Saveyn, H., & Eder, P. (2014). End-of-waste criteria for biodegradable waste subjected to biological treatment (compost & digestate): Technical proposals. IPTS: Sevilla, Spain.

Yuan, Z., Pratt, S., eta Batstone, D. J. (2012). Phosphorus recovery from wastewater through microbial processes. Current opinion in biotechnology, 23(6), 878-883.

Zhang, M., He, L. Y., Liu, Y. S., Zhao, J. L., Liu, W. R., Zhang, J. N., ... eta Ying, G. G. (2019). Fate of veterinary antibiotics during animal manure composting. Science of the Total Environment, 650, 1363-1370.

7. Eskerrak eta oharrak

Lan hau H2020 SMART Plant (G.A. 690323) proiektu Europarrak finantzatu du. Horretaz gain, SCENA sisteman lanean jardun duten eta lortutako produktuen kalitate parametroak neurtu dituzten lankideei eskerrak eman nahi genizkieke: Vincenzo Conca (Universita di Verona); Nicola Frison (Universita di Verona), Matteo Tartini (Alto Trevigiano Servizi), Anita Zamboni (Universita di Verona), Juan Baeza (Universitat Autónoma de Barcelona), Natalia Rey (Universitat Autónoma de Barcelona), Barbara Benedetti (Universita di Roma), Mauro Majone (Universita di Roma), Francesco Fatone (Università Politecnica delle Marche).

Esofagitis Eosinofilikoaren RNA bidezko diagnostiko ez inbaditzailerako proposamen berria

Sebastian-delaCruz, M.[1,2], Garcia-Etxebarria, K.[3], Mendoza, L.M.[1], Cobian, C.J.[3], Tamarit, S.[4], Bilbao, J.R.[1,2,5], Lucendo, A.J.[4], Bujanda, L.[3], Castellanos-Rubio, A.[1,2,5,6]

[1] *Genetika, Antropologia Fisikoa eta Animalia Fisiologia Departamentua, Euskal Herriko Unibertsitatea, Leioa*

[2] *Biocruces Bizkaia Osasun Ikerketa Institutua, Barakaldo*

[3] *Gastroenterologia Departamentua, Biodonostia Osasun Ikerketa Institutua, CIBERehd, Euskal Herriko Unibertsitatea, Donostia*

[4] *Gastroenterologia Departamentua , Tomellosoko Ospitale Nagusia, CIBERehd, La Princesa Osasun Ikerketa Institutua, Tomelloso (Ciudad Real)*

[5] *CIBERDEM, Carlos III Osasun Institutua, Madril*

[6] *IKERBASQUE, Zientziarako Euskal Fundazioa, Bilbo*
maialen.sebastian@ehu.eus

Laburpena

Esofagitis Eosinofilikoa (EoE) gaixotasun inflamatorio kronikoa da, eta bere diagnostikoa esofagoko biopsien eskuratzean eta hauen analisian oinarritzen da. Endoskopia metodo inbaditzailea izanik, lan honen helburua mRNA adierazpenean oinarritutako diagnostikorako metodo ez inbaditzaile berria proposatzea da. Horretarako, 68 gene hautagaien mRNA adierazpena aztertu genuen EoE gaixoen eta kontrolen ahoko mukosa laginetan, eta *HIPK3* eta *PRR15L* geneek aurkeztu zituzten emaitza onenak. Haien mRNA adierazpen balioak kontuan izanik EoE gaixo aktiboak eta kontrolak bereizteko gai izan gara, %80ko asmatze tasarekin. Beraz, ahoko mukosako mRNA adierazpen balioak EoEren diagnostiko ez inbaditzailerako biomarkatzaile egokiak izan daitezkeela uste dugu.

Hitz gakoak: EoE, diagnostiko ez inbaditzailea, aho mukosa, mRNA adierazpena, *HIPK3*, *PRR15L*

Abstract

Eosinophilic esophagitis (EoE) is a chronic inflammatory disease for which diagnosis relies on acquisition of esophageal biopsies and their analysis. Since endoscopy is an invasive procedure, the aim of this work is to propose a novel mRNA expression-based non-invasive EoE diagnostic method. To do so, mRNA expression of 68 candidate genes was analyzed in the oral cavity of EoE patients and controls. HIPK3 and PRR15L showed the best results. Taking into account these genes' mRNA expression values, we were able to distinguish EoE active patiens form controls, with a predictive rate of 80%. Thus, we believe that mRNA expression analysis of the oral cavity is a good non-invasive EoE diagnostic tool.

Keywords: EoE, non-invasive diagnosis, oral cavity, mRNA expression, HIPK3, PRR15L

1. Sarrera eta motibazioa

Esofagitis eosinofilikoa gaixotasun inflamatorio kronikoa da. Eosinofiloen infiltrazioa esofagoko mukosan eta esofagoaren disfuntzioa dira bere ezaugarri nagusiak, eta diagnostikorako erabiltzen diren kriterioak. EoEren prebalentzia azkar igo da azken bi hamarkadetan, gaixotasunaren ezagutza emendatu eta diagnosirako irizpideak zehaztu ahala. Gaur egun, EoE esofagitis kronikoaren bigarren eragile nagusia da, errefluxu gastroesofagikoaren atzetik, eta disfagiaren kausa ohikoena haurren eta gazteen artean (Hirano et al., 2020; Navarro et al., 2019).

Gaixotasunaren diagnostikorako, aipatutako irizpideak konfirmatu behar dira gaixoaren esofagoan bertan. Horretarako, endoskopia egitea beharrezkoa da, esofagoaren biopsiak eskuratu eta horien analisia egin ahal izateko. Gutxienez 6 biopsia hartzea gomendatzen da esofagoko bi toki desberdinetik (normalean goiko eta beheko erditik hiruna biopsia), eta mukosa esofagikoan

anomalia endoskopikoetan arreta jarrita (Lucendo et al, 2017). Biopsia horietan esofagoaren egitura, morfologia eta egon daitekeen eosinofiloen infiltrazioa aztertzen dira. Azken horretarako potentzia handiko eremu bakoitzeko (HPF, *High Power Field* ingelesezko hitzetatik) eosinofiloak zenbatzen dira. Kontaketa horretan 15 eosinofiloko langak %100eko sentsibilitatea eta% 96ko espezifikotasuna erdiesten ditu diagnosian. Hori dela eta, bera da gehien erabiltzen den diagnostikorako irizpidea (Dellon et al., 2015).

Azkenik, endoskopia eta biopsien eskuratzea anestesiapean egiten badira ere (nahiz eta urria izan, horrek suposatu dezakeen arriskuarekin) prozedura desatsegin eta inbaditzaileak dira pazienteentzat, batez ere haurrentzat. Horregatik, EoErako diagnostiko metodo ez inbaditzaile baten beharra ikusten dugu, endoskopia ekidin edota kopurua murriztu ahal izateko.

2. Arloko egoera eta ikerketaren helburuak

Gaixotasunaren berezko gene-adierazpen balioetan oinarritutako biomarkatzaileak tresna baliagarriak dira gaixotasuna aurreikusteko. EoEren kasuan, hainbat gene-adierazpen analisi burutu dira dagoeneko eta ezagunak dira gaixotasunean ezberdin adierazten diren geneak. Dena dela, analisi horiek EoE gaixoen biopsia laginetan burutu dira (Wen et al., 2015; Wheeler et al., 2019); beraz, oso tresna interesgarria eta baliagarria den arren, endoskopia prozedura beharrezkoa da horietan ere.

Ahoa digestio aparatuko lehen atala da, eta hori kontuan izanik ahoko mukosak digestio aparatuan beherago dauden mukosen antza izan dezakeela hipotetizatu da; beraz, esofagoan gerta daitezkeen aldaketak ahoko mukosan ere beha daitezkeela uste dugu. Izan ere, ahoak eta esofagoak epitelio ezkatatsuaren patologia bera dutela eta biomarkatzaile gisa erabili ahal diren proteina eta RNA molekula ugari daudela iradoki da (Hayat et al., 2015).

Hori guztia kontuan izanik, ikerketa honen helburu nagusia EoEren diagnostikorako aho mukosaren laginetan burutzeko metodo ez inbaditzailea proposatzea da, geneen adierazpenean oinarrituta (zehazki mRNA mailetan). Horretarako, bi azpi helburu planteatu ditugu:

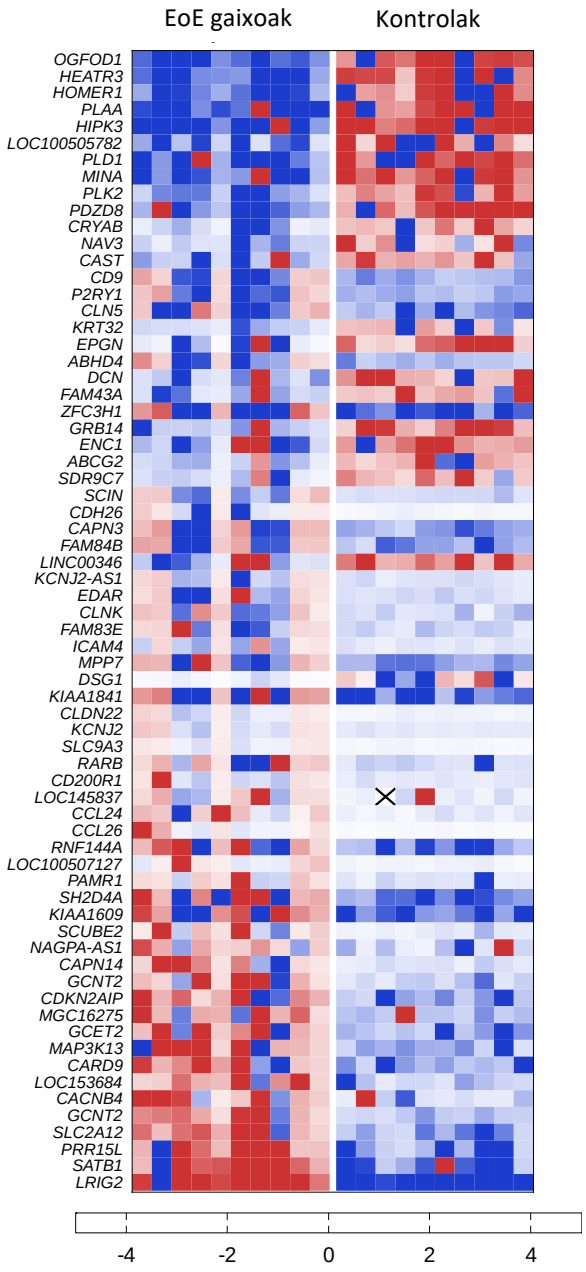
1) Esofagoko biopsietan adierazten diren geneak, ahoko mukosa-laginetan ere kuantifikatzeko gai garela ziurtatzea, eta gene horien adierazpen aldaketak berrestea.
2) Aho mukosaren laginetatik abiatuz EoE diagnostikatzeko biomarkatzaile egokiak aurkitzea.

3. Ikerketaren muina

3.1. Gene hautagaien aukeraketa eta konfirmazioa aho mukosetako laginetan

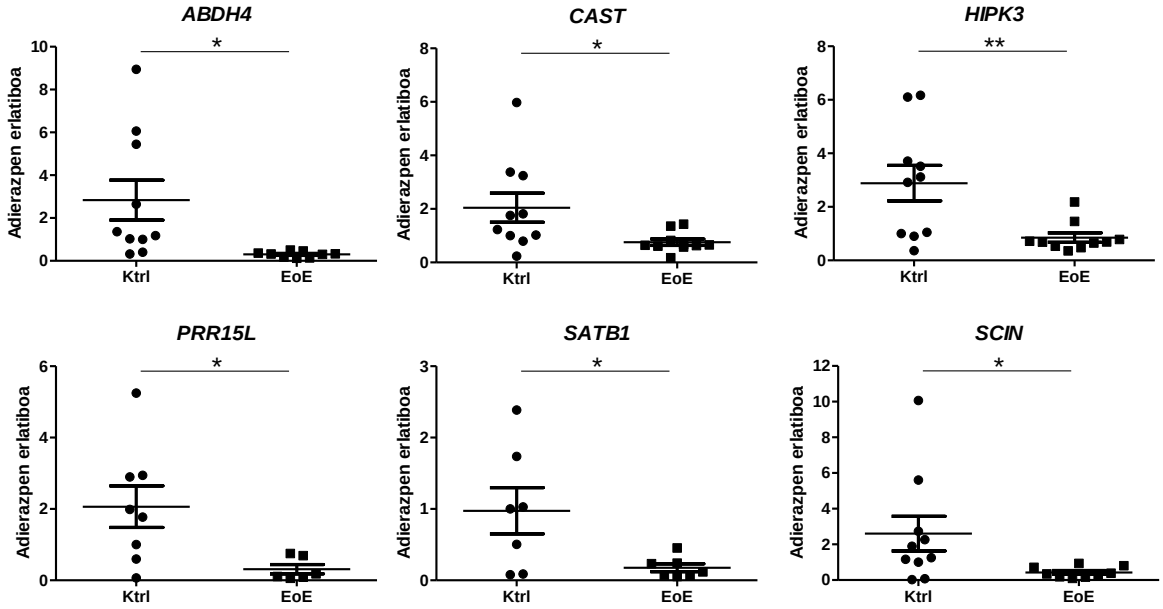
Aho mukosan aztertuko ziren gene-hautagaiak aukeratzeko, EoE pazienteen eta kontrolen biopsien adierazpena publikoki eskuragarri dagoen RNAseq esperimentu batetik (Wheeler et al., 2019) eskuratu genituen. Bertatik, EoE kasuen eta kontrolen artean adierazpen maila ezberdina zuten 68 gene hautagai aukeratu genituen; horietatik 45 gainadierazita eta 23 azpiadierazita zeuden (1. Irudia).

1. irudia. RNAseq-eko datuetan oinarritutako mRNA adierazpen balioen bero-mapa. Lerroetan geneak eta zutabeetan giza laginak irudikatu dira. Karratutxo bakoitzean, ilarako genearen adierazpen erlatiboa ikus daiteke. Kolore urdinak eta gorriak adierazpen-maila baxua eta altua adierazten dituzte, hurrenez hurren.

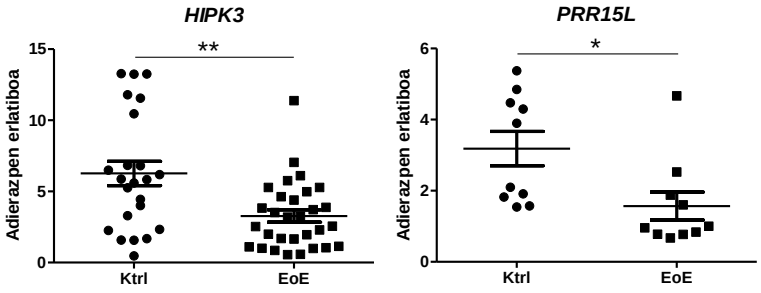


Gene hautagai horiek aho mukosan ere adierazten ote ziren aztertu genuen 10 EoE paziente eta 10 kontroletan. Horretarako, lehendabizi RNA erauzi genuen aho mukosako laginetatik. Orokorrean RNA kantitate baxuak lortzen dira lagin mota honetatik. Hori dela eta, gene hautagaien kuantifikaziorako RT-qPCR (RNAren alderantzizko transkripzioa-PCR kuantitatiboa) teknika erabili genuen. Izan ere, RT-qPCRaren abantailetako bat, RNA kantitate baxuekin lan egiteko aukera eskaintzen duela da. Guztira 29 generen adierazpena kuantifikatu ahal izan genuen, erdia baino gutxiago, %43a hain zuzen. Horietatik 6 genek (*ABDH4*, *CAST*, *HIPK3*, *PRR15L*, *SATB1*, *SCIN*) taldeen arteko adierazpen aldaketa esanguratsuak aurkeztu zituzten (2. Irudia).

2. irudia. Lehenengo kohortean modu esanguratsuan ezberdin adierazitako geneen mRNA adierazpen erlatiboak. 10 kontrol (Ktrl) eta 10 EoE gaixoen (EoE) mRNA adierazpena neurtu genuen. Gene bakoitzaren adierazpen balioak *GAPDH* gene etxezainarekiko erlatibizatu ziren. Estatistika kalkuluak Student t testarekin egin ziren, *p<0,05 eta **p<0,01 esan nahi dutelarik.



3. irudia. Bigarren kohortean modu esanguratsuan ezberdin adierazitako geneen mRNA adierazpen erlatiboak. 25 kontrol (Ktrl) eta 37 EoE gaixoen (EoE) mRNA adierazpena neurtu genuen. Gene bakoitzaren adierazpen balioak *GAPDH* gene etxezainarekiko erlatibizatu ziren. Estatistika kalkuluak Student t testarekin egin ziren, *p<0,05 eta **p<0,01 esan nahi dutelarik.



3.2. Gene hautagaiak biomarkatzaile gisa baliozkotzea

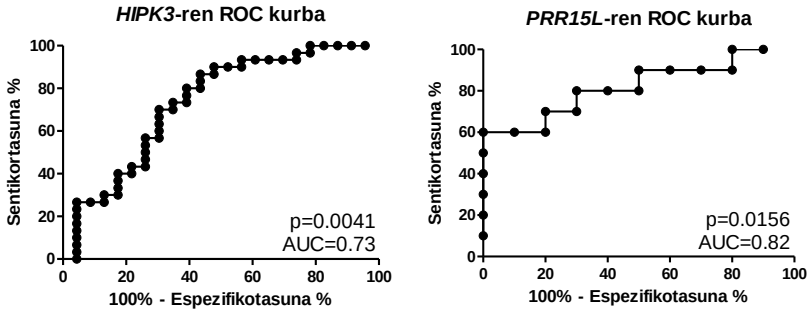
Lehenengo analisian konfirmatutako sei geneen adierazpena 37 EoE gaixo aktiboren eta 25 kontrolen lagin multzo handiagoan aztertu ziren. Horietako bi genetan, *HIPK3* eta *PRR15L*, EoE eta kontrolen arteko adierazpen aldaketa berretsi genuen, nahiz eta *PRR15L* genearen adierazpena laginen herenean baino ez antzeman, seguruenik esperimentuan erabilitako RNA kantitatea baxua zelako (3. Irudia).

Bi gene horien adierazpenaren iragarpen ahalmena kalkulatzeko eta biomarkatzaile egokiak izan daitezkeen ebaluatzeko gene bakoitzaren ROC (*Receiver Operating Characteristic* ingelesezko hitzetatik) kurbaren analisia burutu genuen. ROC kurba balio jarraiak ematen dituzten diagnostiko-probetan ebakitze puntua aukeratzeko erabiltzen den funtzio matematikoa da. Ebakitze puntu posible desberdinekin lortutako sentikortasun eta espezifikotasun balioekin ROC izeneko kurba irudikatzen du. Gainera, ROC kurbaren azpiko area (AUC, *Area Under the Curve* ingelesezko hitzetatik) diagnostiko probaren indarraren adierazletzat hartzen da, eta

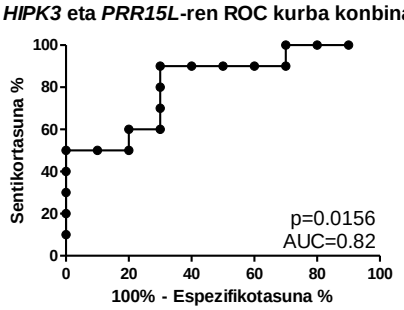
edozein paziente zuzen diagnostikatzeko probabilitatea islatzen du. *HIPK3* genearen kasuan, AUC balioa 0,73 izan zen, eta %73,3ko sentikortasuna eta %65,2ko espezifikotasuna lortu genituen. *PRR15L*ren kasuan berriz, AUC balioa 0,80 izan zen, eta %80ko sentikortasuna eta %70eko espezifikotasuna lortu genituen (4. Irudia).

Honez gain, bi geneak konbinatuta lor daitekeen iragarpen ahalmena ere kalkulatu genuen. Erregresio logistikoa erabili genuen bi geneen adierazpen balioak konbinatzeko, eta berriro burutu genuen ROC kurbaren analisia. ROC kurba konbinatua geneak bakarka aztertzea baino eraginkorragoa zela ikusi genuen. Izan ere, 0,82ko AUC balioa, %90eko sentikortasuna eta %70eko espezifikotasuna lortu genuen (5. Irudia).

4. irudia. *HIPK3* eta *PRR15L* geneen bakarkako ROC kurbak. ROC kurbaren puntu bakoitza (zirkulu beltzak) diagnostiko probaren ebakitze puntu posible bati dagokio, eta dagokion sentikortasuna (Y ardatza) eta espezifikotasuna (X ardatza) jakinarazten dizkigu. AUC=Kurbaren azpiko area.



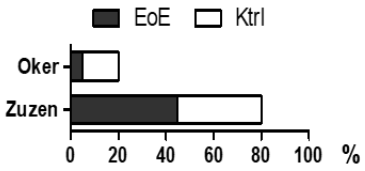
5. irudia. *HIPK3* eta *PRR15L* gene konbinazioaren ROC kurba. ROC kurbaren puntu bakoitza (zirkulu beltzak) diagnostiko probaren ebakitze puntu posible bati dagokio, eta dagokion sentikortasuna (Y ardatza) eta espezifikotasuna (X ardatza) jakinarazten dizkigu. AUC=Kurbaren azpiko area.



4. Ondorioak

HIPK3 eta *PRR15L* geneen mRNA adierazpen balioetan oinarrituta EoE gaixo aktiboak eta kontrolak bereizteko gai izan gara, %80ko asmatze tasarekin (6. Irudia). Beraz, ahoko mukosetako mRNA adierazpen balioak EoEren diagnostiko ez inbaditzailerako biomarkatzaile egokiak izan daitezkeela uste dugu. Izan ere, sentikortasun eta espezifikotasun balio altuak lortu ditugu ere, eta ondorioz iragarpen ahalmen handiko diagnostiko proba garatzeko aukera egon daitekeela aurreikusten dugu, %100ean asmatu ez arren, metodo tradizional eta inbaditzailearen aldean merkeagoa eta erosoagoa izango litzatekeena.

6. irudia. *HIPK3* eta *PRR15L* gene konbinazioaren diagnostikorako iragarpen ahalmena. Gris ilunez EoE gaixoak adierazi dira (EoE), eta zuriz kontrolak (Ktrl). Bi taldeak kontuan hartuta, kasu guztien %80an, EoE gaixoak edota kontrolak ondo diagnostikatuak izan dira.



5. Etorkizunerako planteatzen den norabidea

Alde batetik *PRR15L* mRNA adierazpenaren kuantifikatzeko ahalmena emendatu beharko genukeela uste dugu. Izan ere, bigarren kohorteko laginen herenean soilik kuantifikatu ahal izan dugu *PRR15L* genearen adierazpena. Beraz, kuantifikazio ahalmena hobetuz gero, RNA kantitate gehiago erabiliz adibidez, etorkizunean lagin gehiagoren adierazpen datuak izango genituzke eta ondorioz, emaitzak osatuagoak lortuko genituzke.

Bestetik, ikerketa honetan EoE gaixo aktiboak baino ez ditugu kontuan izan, hau da, laginketa momentuan tratamendurik jasotzen ez zutenak eta gaixotasunaren irizpideak betetzen zituztenak soilik erabili genituen. Etorkizunean, ikerketa hau gaixoen talde desberdinetara ere zabaldu nahi dugu, gaixotasunaren egoeraren araberako analisia burutu ahal izateko.

6. Erreferentziak

Dellon ES, Speck O, Woodward K, et al. (2015), Distribution and variability of esophageal eosinophilia in patients undergoing upper endoscopy, *Mod Pathol*, 28, 383–390.

Hayat JO, Gabieta-Somnez S, Yazaki E. et al. (2015), Pepsin in saliva for the diagnosis of gastro-oesophageal reflux disease, *Gut*, 64(3), 373-380.

Hirano I, Chan ES, Rank MA et al. (2020), AGA Institute and the Joint Task Force on Allergy-Immunology Practice Parameters Clinical Guidelines for the Management of Eosinophilic Esophagitis. *Gastroenterology*, 158(6), 1776-1786.

Lucendo AJ, Molina-Infante J, Arias Á et al. (2017), Guidelines on eosinophilic esophagitis: evidence-based statements and recommendations for diagnosis and management in children and adults, *United European Gastroenterol J*, 5(3), 335-358.

Navarro P, Arias Á, Arias-González L et al. (2019), Systematic review with meta-analysis: the growing incidence and prevalence of eosinophilic oesophagitis in children and adults in population-based studies, *Aliment Pharmacol Ther*, 49(9), 1116-1125.

Wen T, Stucke EM, Grotjan TM, et al. (2013), Molecular diagnosis of eosinophilic esophagitis by gene expression profiling, *Gastroenterology*, 145(6), 1289-1299.

Wheeler JC, Vanoni S, Zeng C, et al. (2019), 17β-Estradiol protects the esophageal epithelium from IL-13-induced barrier dysfunction and remodeling, *J Allergy Clin Immunol*, 143(6), 2131-2146.

7. Eskerrak eta oharrak

Ikerketa honek ACRri emandako Espainiako Zientzia, Unibertsitate eta Berrikuntza Ministerioaren (SAF2017-91873 - EXP), Eusko Jaurlaritzako Osasun Sailaren (EJ-2017111082) eta Madrileko Asociación de Celiacos y Sensibles al Gluten erakundearen beken laguntza izan du. MSdlC doktoradutza burutzen ari da Euskal Herriko Unibertsitateko doktorego aurreko beka bati esker. Honez gain, alde batetik, nire lankideak eta zuzendariak, eta bestetik, laginak jaso dituzten medikuak ere eskertu nahi nituzke.

Sentinel-2 irudiekin erretako eremuak detektatzeko algoritmoa eta produktua Saharaz hegoaldeko Afrikan

Roteta, E., Bastarrika , A.

Meatze eta Metalurgia Ingeniaritza eta Materialen Zientzia, Vitoria-Gasteizko Ingeniaritza Eskola, Euskal Herriko Unibertsitatea (EHU), Nieves Cano 12, 01006 Gasteiz
ekhi.roteta@ehu.eus

Laburpena

Sentinel-2 datuetan eta MODIS sute aktiboetan oinarritutako algoritmo automatiko bat garatu da, erretako eremuak detektatzeko, Saharaz hegoaldeko Afrika osoa 2016ko urtarril eta abenduaren artean 20m-ko bereizmen espazialarekin prozesatzeko erabili zena. Landsat irudietatik eratorritako erreferentzia-datuekin konparatuz baliozkotu zen erretako eremuen produktu hau, antzeko komisioak lortuz baina aurrez bereizmen baxuko produktu globalekin baino omisio gutxiagorekin. Gure produktuak 4,9 M km^2-ko azalera errea detektatu zuen guztira, inguru eta periodo berean produktu globalek detektatu zuten azalerarekiko %50 baino gehiagoko igoerarekin.

Hitz gakoak: suteak, erretako eremuak, Sentinel-2, Afrika

Abstract

An automatic algorithm for burned area detection based on Sentinel-2 data and MODIS active fires was developed, which was used to process the whole sub-Saharan Africa at 20 m of spatial resolution, from January to December 2016. The validation of the burned area product was carried out by comparing it with reference data generated from Landsat imagery, with similar commissions but much less omissions than those found for global products at low resolution. Our product detected a total BA of 4.9 M km^2, which means an increase of more than 50% from the surface detected by global products in the same area and period.

Keywords: fires, burned area, Sentinel-2, Africa

1. Sarrera, motibazioa eta momentuko egoera

Suteek landaretza erre, lurzorua higatu, hainbat gas eta aerosol atmosferara igorri, eta gizakien bizimoduari eragiten die, bizitzak arriskuan jartzeaz gain. Historikoki, suteak naturaren klima-oszilazioekin erlazionatuta zeuden, tenperatura-igoerekin gertatzen baitziren latitude ertain eta altuetan, eta prezipitazio-aldaketekin ekuatore inguruan (Daniau et al., 2013; Marlon et al., 2013). Azken mendeetan, ordea, gizakion jarduerek eragin zuzena izan dute suteengan, eta hauen erregimenak eta patroiak aldatzen ari dira (Gilroy et al., 2014). Urtetik urtera azalera handiagoa erretzen da munduan klima-aldaketaren eraginez, eta biomasa gehiago erretzeak atmosferara berotegi-efektuko gas gehiago isuri eta klima-aldaketa areagotzen laguntzen du, aldi berean (Knorr et al., 2016).

Suteen eragin hauek guztiak direla eta, garrantzi handia eman zaio erretako eremuak (BA, ingelesezko *burned area*tik) zehaztasunez detektatzeari; hau teledetekzio bidez egin izan da gehienbat, hau da, sateliteetako irudiak aztertuz (Chuvieco et al., 2019). Lurraren behaketarako erabiltzen diren sateliteek hainbat banda izaten dituzte, espektro elektromagnetikoan zehar banatuta eta uhin-luzeraren arabera bereiziak. Banda horietako bakoitzak lurrazalak dagokion uhin-luzerako argiari edo energia elektromagnetikoari nola erantzuten dion adierazten du; beste modu batera esanda, eguzkitik jasotako energiaren zein portzentaje islatzen duen, erreflektibitatea deitua, erakusten du. Erreflektibitateen banda hauek 0.4 – 2.5 μm arteko uhin-luzeren eremuan kokatzen dira normalean; banda termikoek, aldiz, 10 – 13 μm artean kokaturik, lurrazalaren tenperatura erakusten dute, gorputz orok energia jakin bat irradiatzen baitu duen tenperaturaren arabera. Lurrazaleko objektuek uhin-luzeraren arabera islatzen edota irradiatzen duten energia hau aztertuz hainbat gertakari natural detektatzean datza teledetekzioa.

Erretako eremuen (BA) hainbat produktu global (mundu mailakoak) garatu dituzte azken 20 urteetan, hau da, sateliteetako irudietan oinarrituz modu automatikoan detektatutako suteak identifikatzen dituzten mapak, non eta noiz erre diren adieraziz. Lehenak bereizmen espazial baxukoak ziren (1×1 km^2-ko pixelak) eta hainbat errore zituzten, baina produktuak hobetuz joan dira sateliteetako sentsoreak eta algoritmoak hobetu ahala. Gaur egun bi BA produktu global nagusi daude, biak NASAren Aqua eta Terra sateliteetako MODIS sentsorearen eguneroko irudietan oinarrituta eta 2001etik aurrera prozesatuak: MCD64A1c6 500 m-ko bereizmen espazialarekin (Giglio et al., 2009) eta FireCCI51 250 m-koarekin (Lizundia-Loiola et al., 2020). Biek ala biek erreflektibitate-bandetan oinarrituta egoteaz gain sute aktiboen datuak erabiltzen dituzte, hau da, banda termikoetan normala baino tenperatura altuagoa erakusteagatik detektatutako suak, sentsoreak irudia hartu zuen momentuan erretzen ari zirenak. Bereizmen espazial ertaineko (< 100 m) produktu global bakarra dago oraingoz, GABAM, orain dela gutxi argitaratua (Long et al., 2018); Landsat irudietatik eratorrita dago, 30 m-ko pixelarekiko irudi bat izanik 16 egunean behin, baina ez du sutearen datari buruzko informaziorik eskaintzen.

2. Ikerketaren helburuak

Aurreko atalean aipatu bezala, bereizmen espazial ertaineko BA produktuak oso urriak dira eta, beraz, algoritmo automatiko berri bat sortu genuen ikerketa honetan, Sentinel-2 (S2) satelitearen MSI sentsorearen datuetan oinarrituz. Satelite hau 2015ean jarri zuen abian Europako Espazio Agentziak (ESA, ingelesezko *European Space Agency*-tik), eta doako satelite-irudien artean orain arteko bereizmen espazial hoberena du: 10 edo 20 m, banda espektralaren arabera, 10 egunean behin irudi bat lortuz. Saharaz hegoaldeko Afrikan (SHA) aplikatu genuen algoritmoa, bertan baitago munduan erretako azalera osoaren % 70 inguru (Randerson et al., 2012), 2016 urtean erretako azalera guztiak detektatuz 20 m-ko zehaztasunarekin. Sortutako BA produktua FireCCISFD11 izenpean eman zen argitara (Roteta et al., 2019).

3. Ikerketaren muina

3.1. Algoritmoa eta BA produktua

Erretako eremuak detektatzeko algoritmoa Afrikako ezaugarri espektraletara moldatuta dago eta zeharo automatikoa da. Bi datu-iturri erabiltzen ditu: batetik Sentinel-2 satelitearen erreflektibitate-irudiak, eta bestetik MODIS irudietatik eratorritako sute aktiboen MCD14ML produktua. Bi datatako irudi banaren artean aplikatzen da algoritmoa, bien arteko aldaketak aztertuz; bi irudi hauetan lehenari *pre* deituko zaio hemendik aurrera, eta bigarrenari *post*, detektatu beharreko suteen aurreko eta ondorengo egoerak erakusten baitituzte. S2 irudiak MGRS sare erregularraren arabera zatituta daude, 110×110 km^2 inguruko gelaxketan, eta gelaxka hauetako bat prozesatzen du algoritmoak aldiko.

Algoritmoa bera exekutatu aurretik irudiak prestatu egin behar dira, biei maskara bana aplikatuz lainoak, lainoen itzalak eta ur-masak analisitik kanpo gera daitezen. Gainera, bi indize espektral kalkulatzen dira irudi bakoitzean, banden arteko eragiketa bidez: MIRBI (Trigg and Flasse, 2001) eta NBR2 (García and Caselles, 1991). Gertuko infragorriko (NIR) erreflektibitateak eta bi indize hauek bakarrik erabiliko ditu ondoren algoritmoak. Hiru banda hauek erretako eremuak detektatzeko gaitasun handiena erakutsi zutelako aukeratu ziren, Afrikan zehar banatutako 52 ikerketa-eremutan egindako analisi espektral batean; banda bakoitzarentzat atalase finko bana ere neurtu zen analisi honetan, erretako eta erre gabeko eremuak bereizteko.

Lehenik erretako eremu batzuk identifikatzen ditu, baldintza batzuk definituz: bi irudien artean NIR, MIRBI eta NBR2 balioek atalase finko batek baino aldaketa handiagoa izan behar dute (aurreko analisi espektralean lortutako atalaseak), eta aldi berean identifikatutako eremuek MCD14ML produktuko sute aktibo baten inguruan egon behar dute. Baldintza hauek betetzen ez dituzten pixelak erre gabekotzat hartzen dira. Behin erretako eta erre gabeko pixelen bilduma

bana izanik, hauek MIRBI eta NBR2 indize espektraletan dituzten balioak aztertu, eta balio hauetan oinarrituz irudiak sailkatzen ditu algoritmoak. Honela, probabilitate-irudi bat lortzen da, % 0 (erre gabe) eta % 100 (erreta) arteko balioekin.

Azkenik, bi faseko estrategia bat aplikatzen zaio probabilitateen irudi honi. Estrategia honek lehenik erretako seinale espektral oso sendoa duten pixel batzuk identifikatzen ditu, haziak deiturikoak, eta ondoren hazi hauen inguruan eremua zabalduz joaten da probabilitateen irudian atalase batetaraino iritsi arte; honela, erre izanaren probabilitate altua izan baina barnean hazi hauetako bakar bat bera ere ez duten eremuak erroretzat hartu eta baztertu egiten dira (Bastarrika et al., 2011). Kasu honetan, erretako pixelen bildumako seinale espektral erreena dutenak aukeratzen dira hazi bezala; honek benetan erre ez ziren azalera asko baztertu zituen, nekazaritza-soroak batez ere, uzta jaso osteko seinale espektrala erretakoaren oso antzekoa baitute.

Algoritmo hau BA produktu bat sortzeko erabili zen, FireCCISFD11 deiturikoa, ESAren Fire_cci proiektuaren barnean. Saharaz hegoaldeko Afrikan (SHA) 2016ko irudi guztiak prozesatu ziren, urte horretan erretako eremu guztiak detektatuz 20 m-ko bereizmen espazialarekin (S2 irudien bereizmena); ez zegoen orain arte hain eremu zabala estaltzen zuen bereizmen honetako produkturik, GABAMek, produktu globala izan arren, 30m-ko bereizmena baitu.

3.2. Baliozkotzea

SHAko BA produktua baliozkotu ahal izateko hainbat erreferentzia-datu sortu ziren 45 gune ezberdinetan, bi datatako Landsat irudien artean erretako eremuak detektatzeko software baten bidez (Bastarrika et al., 2014). Erreferentzia datu hauek periodo jakin batean erretako eremuak erakusten dituzte zehaztasun handiarekin, eta BA produktua hauekin konparatu zen zein errore zituen ikusteko. Bi errore nagusi neurtzen dira kasu hauetan: komisioak, produktuak erretakotzat detektatu dituen pixelekiko berez erreta ez daudenen portzentajea; eta omisioak, guztira benetan erre direnekiko produktuak detektatu ez dituenen portzentajea. Hauez gain, Dice koefiziente edo DC ere neurtu zen, honakoa adierazten duelarik: produktuak edo erreferentzia-datuek, bietakoren batek, pixel bat erretakotzat hartzen badu, besteak ere erreta detektatzeko dagoen probabilitatea. Gure produktuaz gain (FireCCISFD11) bereizmen baxuko bi produktu erabilienak ere, MCD64A1 eta FireCCI51, baliozkotu egin ditugu erreferentzia-datu berberekin. GABAM produktua, orain arteko bereizmen ertaineko produktu global bakarra, ez dute prozesatu oraindik 2016rako zoritxarrez eta ezin izan dugu baliozkotu.

Baliozkotze honen emaitzak 1. taulan ikus daitezke, eta gure produktuaren emaitzak nabarmen hobeak dira. Komisioak ez dira produktu globalenak baino askoz hobeak, baina omisioak asko jaitsi dira, lehengo % 50-60 arteko balioen erdiraino; DC indizea ere % 55 ingurutik % 77raino igo da. Emaitza hobe hauek bereizmen espazialari esker hobetu dira dudarik gabe, MCD64A1 eta FireCCI51 produktuek 500 eta 250 m-ko bereizmena baitute, oso baxuak gure FireCCISFD11en 20 metroen aldean.

1. taula. BA produktuen baliozkotzearen emaitzak, gure produktua eta bere emaitzak letra lodiz adierazita daudelarik; unitate guztiak ehunekotan daude.

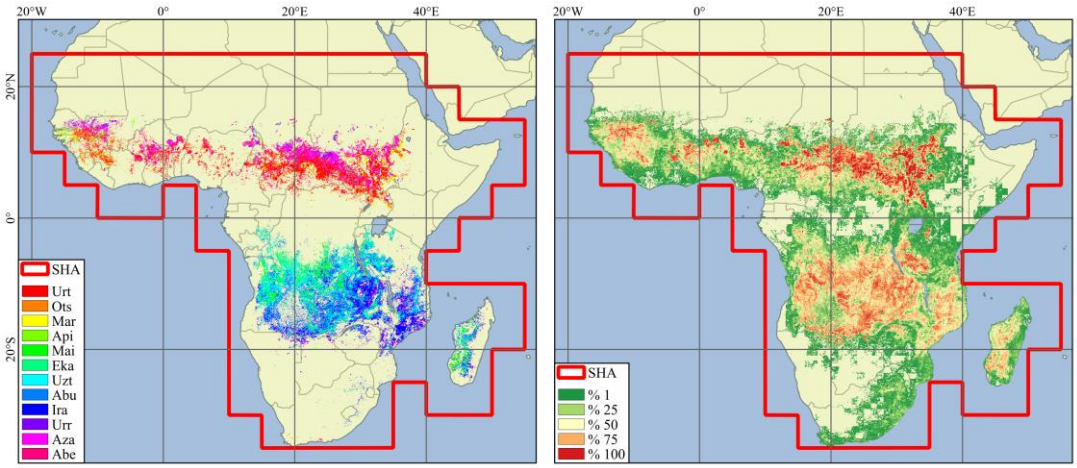
Produktua	Komisioak	Omisioak	DC
FireCCISFD11	**19,3**	**26,5**	**77,0**
MCD64A1	20,4	59,6	53,6
FireCCI51	25,7	54,5	56,4

3.3. Produktuaren emaitzak

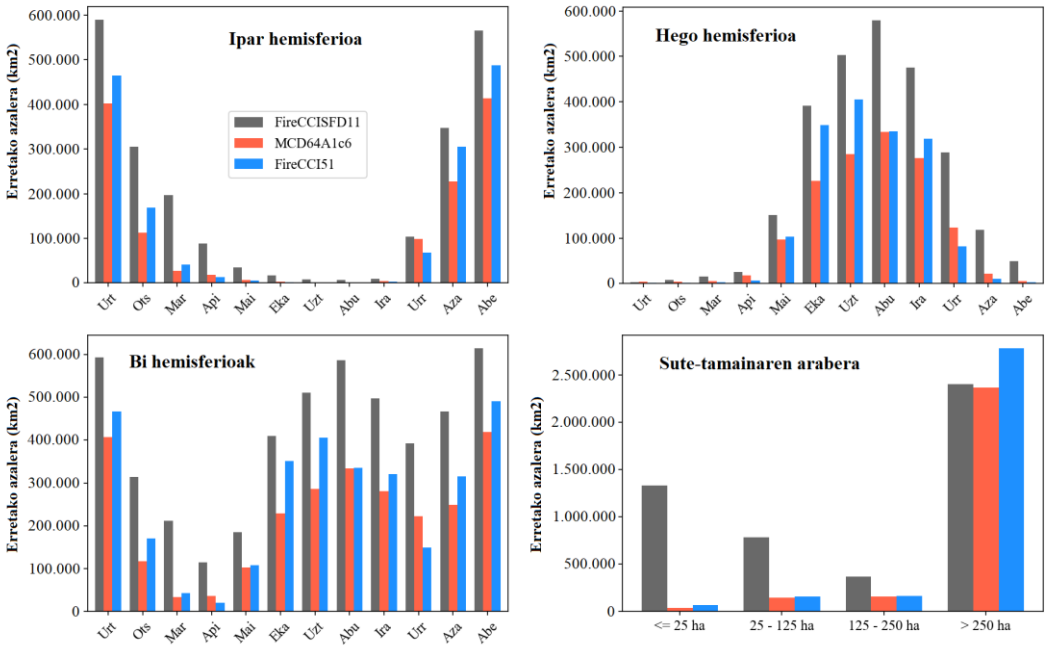
FireCCISFD11 produktuaren emaitza orokorrak 1. irudian ikus daitezke. Ekuatoreaz iparraldera lehenik urtarriletik martxora erre zen azalera handiena, eta ondoren urrian hasi eta

abendura arte; hego hemisferioan, aldiz, maiatza eta urria artean erre zen gehien. Leku batzuetan lurrazalaren ia % 100 erre zen 2016an, eta ipar hemisferioko gune batzuetan gehiago ere bai; azken hauetan eremu batzuk bi aldiz erre ziren, lehenik urtarrilean edo otsailean eta gero azaro-abenduan, elkarren artean ia urtebeteko aldearekin.

1. irudia. Gure BA produktuaren emaitzak SHAn; ezkerrean urteko zein garaitan erre den, eta eskuinean lurrazalaren erretako portzentajea.



2. irudia. Hainbat BA produktuk detektatutako azalera totalak, hemisferio bakoitzean hilabeteka, eta sute-tamainaren arabera. Unitateak kilometro karratuak (km^2) dira.



Guztira 4,9 milioi km^2 izan zen gure produktuak detektatutako azalera errea; honek % 80 edo % 54 inguruko igoera esan nahi du MCD64A1 eta FireCCI51 produktu globalek eremu eta denbora-tarte berean detektatu zutenarekiko (2,7 eta 3,2 milioi km^2, hurrenez hurren). Azalera hauek hilabeteka zatituta ikus daitezke 2. irudian, non urte osoan zehar antzeko banaketa izan baitute hiru produktuek, betiere FireCCISFD11ek azalera gehien detektatuz, eta MCD64A1ek gutxien. Aurrez 1. irudian ikusi bezala, ipar hemisferioan urtearen hasieran eta amaieran gertatzen dira sute guztiak, eta hego hemisferioan, aldiz, erdialdean. Gure produktuaren eta produktu globalen arteko aldea suteen tamainaren araberako konparaketan ikusten da ondo: sute

handienentzat (> 250 ha) antzeko azalera detektatu dute hirurek, 2,4-2,8 milioi km^2 artean, baina sute txikiagoak ez dituzte ia detektatu ere egin produktu globalek, 25 ha baino txikiagoak batez ere. Kontuan izan behar da produktu hauek bereizmen baxuak dituztela, 500 eta 250 m-koak hurrenez hurren, eta beraz 25 ha pixel bakar baten azalera dela MCD64A1en kasuan, eta 4 pixelena FireCCI51entzat.

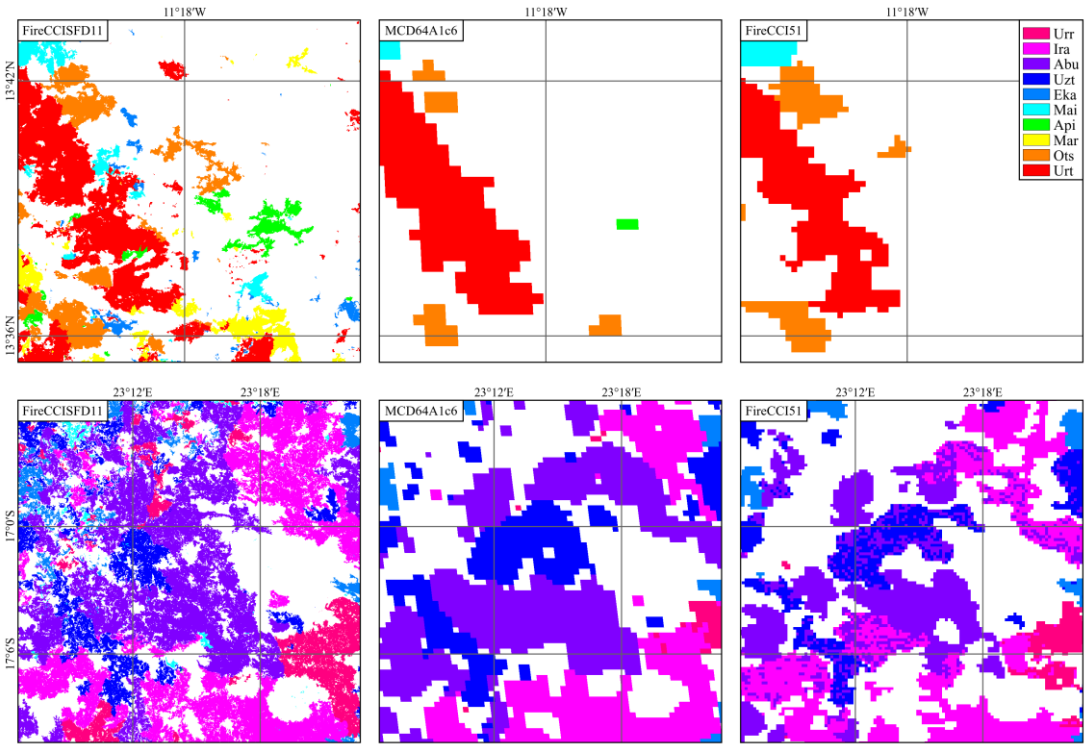
4. Ondorioak

Sentinel-2 irudietan eta MODIS sute aktiboetan oinarritutako algoritmo automatiko bat sortu dugu, Saharaz hegoaldeko Afrikan erretako eremuak detektatzeko, 20 m-ko bereizmen espazialeko produktu bat sortuz. Maila honetako lehen produktua izan da komunitate zientifikoan, aurrez zegoen produktu bakarrak (GABAM), globala izan arren, bereizmen baxuagoa baitzuen (30 m) eta ez zuen pixel bakoitza urteko zein garaitan erre zen erakusten, zientzialarientzat nahiko garrantzitsua den informazioa.

FireCCISFD11 produktuaren zehaztasuna baliozkotzearen emaitzek erakusten dute, produktu globalek baino askoz errore baxuagoekin. Gainera, baliteke erroreak berez hemen kalkulatutakoak baino baxuagoak izatea. Izan ere, erreferentzia-datuak baliozkotu beharreko produktua baino bereizmen altuagokoak izan behar lirateke, baina Sentinel-2 irudien 20 metroak baino pixel txikiagoko beste irudirik ez dago oraingoz, eta ondorioz bereizmen baxuagoko Landsat irudiak erabili ziren honetarako, 30 m-rekin. Halere, produktu globalekin konparatuz gero, omisioak erdiraino jaitsi dira.

Gure produktu honek komisioak ere izan ditu ordea, hau da, berez erre ez diren baina gure produktuan erreta azaltzen diren guneak. Bi jatorri nagusi dituzte. Batetik, algoritmoaren hasieran aplikatutako maskarak ez ditu laino eta lainoen itzal guztiak kendu, eta hauetako asko erreta baleude bezala detektatu ditu gero algoritmoak, berez erreta ez bazeuden ere. Bestetik, nekazaritza-soroetan uzta jaso berritan lurrazalak erretako eremuen oso antzeko seinale espektrala izaten du, eta hauek ere komisio bezala azaltzen dira gure produktuan; arazo hau ez da berria, beste BA algoritmo askok ere bai baitute.

3. irudia. FireCCISFD11, MCD64A1 eta FireCCI51 BA produktuen arteko konparaketa, bi eremutan. Lehen ilara Senegalen dago kokatuta, eta bigarrena Zambian.



Produktu globalekin konparatuta, FireCCISFD11ek benetan zehaztasun handiz detektatzen ditu suteak, 3. irudian ondo ikus daitekeen bezala. Hau bereizmen espazial altuak (20 m) ahalbidetzen du, 500 eta 250 m-ko produktuei (MCD64A1 eta FireCCI51) gehiago kostatzen baitzaie sute handien mugak ongi zehaztea, eta txikienak detektatu ere ez dituzte egiten; frogatuta geratu da beraz bereizmen espazialaren garrantzia. Badirudi bereizmen tenporal baxuagoa izatea ere konpondu egin duela pixelaren tamainak, Sentinel-2 sateliteak 10 egunean behin bakarrik lortzen baitu leku bereko irudi bat, MODISek irudi bat egunero eskaintzen duen bitartean. 4,9 milioi km^2 detektatuz, % 54 edo % 80ko igoera aurkitu da, konparatutako produktu globalaren arabera, Afrikan sute txikiekin % 32 inguru bakarrik igotzea espero bazen ere (Randerson et al., 2012). FireCCISFD11 produktu hau oso garrantzitsua izango da beraz igortzen diren berotegi-efektuko gasak hobeto estimatzeko, orain arte produktu globalak suteak nabarmen gutxiesten ari baitziren.

5. Etorkizunerako planteatzen den norabidea

Ikerketa honetan SHAn urte bakarra (2016) prozesatu da oraingoz. Produktu globalekiko alde nabarmenak azaldu badira ere, berez urte gehiago prozesatu beharko lirateke erretako eremuak hainbeste gutxiesten ote diren egiaztatzeko, hemen ikusi bezala. Hain zuzen ere, ESAren Fire_cci proiektua, FireCCISFD11 produktua sortu zuen berbera, bigarren urte bat prozesatzen ari da orain, algoritmo honexekin; 2019 urtea hain zuzen ere. Bigarren bertsio hau zehatzagoa izatea espero da, bi arrazoi nagusirengatik. Batetik, 2016an satelite bakar baten irudiak erabili ziren, Sentinel-2A-renak, eta hau 10 egunean behin pasatzen da lurreko eremu berberaren gainetik. 2017an, ordea, bigarren satelite bat jarri zuen ESAk orbitan, Sentinel-2B, ezaugarri berberekin, eta biak txandakatuz 5 egunean behin lor daiteke irudi bat. Maiztasuna areagotuta, erretako eremuak sarriago behatu eta hobeto detektatzea espero dugu. Eta bestetik, sute aktiboen produktu berri bat argitaratu dute ikerketa hau burutu ondoren, VIIRS sentsorearen datuetatik eratorria (Schroeder et al., 2014), espazialki MCD14ML produktua baino zehatzagoa dena (375 m-ko bereizmena du 500 m-ren ordez), eta honek ere erretako eremuak hobeto identifikatzen laguntzea espero dugu.

Hemen deskribatutako algoritmoa Afrikako ezaugarri espektraletarako egokituta diseinatu zen, baina baliteke hain ongi ez funtzionatzea munduko beste kontinente eta ekosistemetan. Erabilitako atalaseek balio finkoak dituzte, eta gainera banda edo indize espektral jakin batzuetan oinarrituta dago, baina MIRBI indizeak, adibidez, ez ditu hain ondo bereizten erretako eremuak beste lurralde batzuetan. Horrexegatik, ikerketa honen hurrengo pausua mundu osorako algoritmo global bat sortzea litzateke, eta honetan lanean ari gara jada. Landsat nahiz Sentinel-2 sateliteen irudietan oinarrituta, eta berriz ere MODIS sentsoretik eratorritako sute aktiboak erabiliz, algoritmo global bat sortu dugu, munduko hainbat eremu eta ekosistematan probatu eta emaitza txukunak eman dituena. Halere, algoritmoa fintzen ari gara oraindik, nekazaritza-eremuetan komisio handiak egiten baititu. Gainera, algoritmo hau hasieratik Google Earth Engine plataforman garatu dugu. Honako hau Googlek garatutako plataforma bat da, satelite garrantzitsuenen irudiak hodeian kargatuta dituena, erabiltzaileak edozein eragiketa egin dezan; prozesamendu guztia hodeian bertan egiten da, eta azken emaitza bakarrik deskargatzen da (Gorelick et al., 2017). Honek algoritmoa aplikatu eta irudiak prozesatzea ikaragarri erraztuko digu, baita algoritmoa komunitate zientifikoari eskuragarri jartzea ere, edonork nahi duen herrialdeko suteak monitorizatu ahal izateko.

6. Erreferentziak

Bastarrika, A., Chuvieco, E. eta Martín, M.P. (2011): Mapping burned areas from Landsat TM/ETM+ data with a two-phase algorithm: Balancing omission and commission errors. *Remote Sensing of Environment*, 115, 1003-1012.

Bastarrika, A., Alvarado, M., Artano, K., Martínez, M., Mesanza, A., Torre, L., Ramo, R. eta Chuvieco, E. (2014): BAMS: a tool for supervised burned area mapping using Landsat data. *Remote Sensing*, 6, 12360-12380.

Chuvieco, E., Mouillot, F., van der Werf, G.R., San Miguel, J., Tanase, M., Koutsias, N., García, M., Yebra, M., Padilla, M., Gitas, I., Heil, A., Hawbaker, T.J. eta Giglio, L. (2019): Historical background and current developments for mapping burned area from satellite Earth observation. *Remote Sensing of Environment*, 225, 45-64.

Daniau, A.L., Goñi, M.F.S., Martínez, P., Urrego, D.H., Bout-Roumazeilles, V., Desprat, S. eta Marlon, J.R. (2013): Orbital-scale climate forcing of grassland burning in southern Africa. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110, 5069-5073.

García, M.J.L. eta Caselles, V. (1991): Mapping burns and natural reforestation using thematic Mapper data. *Geocarto International*, 6, 31-37.

Giglio, L., Loboda, T., Roy, D.P., Quayle, B. eta Justice, C.O. (2009): An active-fire based burned area mapping algorithm for the MODIS sensor. *Remote Sensing of Environment*, 113, 408-420.

Gilroy, J.J., Woodcock, P., Edwards, F.A., Wheeler, C., Baptiste, B.L.G., Medina Uribe, C.A., Haugaasen, T. eta Edwards, D.P. (2014): Cheap carbon and biodiversity co-benefits from forest regeneration in a hotspot of endemism. *Natural Climate Change*, 4, 503-507.

Gorelick, N., Hancher, M., Dixon, M., Ilyushchenko, S., Thau, D. eta Moore, R. (2017): Google Earth Engine: Planetary-scale geospatial analysis for everyone. *Remote Sensing of Environment*, 202, 18-27.

Knorr, W., Jiang, L. eta Arneth, A. (2016): Climate, CO2 and human population impacts on global wildfire emissions. *Biogeosciences*, 13, 267-282.

Lizundia-Loiola, J., Otón, G., Ramo, R. eta Chuvieco, E. (2020): A spatio-temporal active-fire clustering approach for global burned area mapping at 250 m from MODIS data. *Remote Sensing of Environment*, 236.

Long, T., Zhang, Z., He, G., Jiao, W., Tang, C., Wu, B., Zhang, X., Wang, G. eta Yin, R. (2018): 30m resolution Global Annual Burned Area Mapping based on Landsat images and Google Earth Engine. *Remote Sensing*, 11, 489.

Marlon, J.R., Bartlein, P.J., Daniau, A.L., Harrison, S.P., Maezumi, S.Y., Power, M.J., Tinner, W. Eta Vanniére, B. (2013): Global biomass burning: A synthesis and review of Holocene paleofire records and their controls. *Quaternary Science Reviews*, 65, 5-25.

Randerson, J.T., Chen, Y., van der Werf, G.R., Rogers, B.M. eta Morton, D.C. (2012): Global burned area and biomass burning emissions from small fires. *Journal of Geophyisical Research: Biogeosciences*, 117.

Roteta, E., Bastarrika, A., Padilla, M., Storm, T. eta Chuvieco, E. (2019): Development of a Sentinel-2 burned area algorithm: Generation of a small fire database for sub-Saharan Africa. *Remote Sensing of Environment*, 222, 1-17.

Schroeder, W., Oliva, P., Giglio, L. eta Csiszar, I.A. (2014): The New VIIRS 375m active fire detection data product: Algorithm description and initial assessment. *Remote Sensing of Environment*, 143, 85-96.

Trigg, S. eta Flasse, S. (2001): An evaluation of different bi-spectral spaces for discriminating burned shrub-savannah. *International Journal of Remote Sensing*, 22, 2641-2647.

7. Eskerrak eta oharrak

Ikerketa hau ESAren Fire_cci proiektuaren barnean burutu zen gehienbat, 4000115006/15/I-NB kontratupean. Proiektu honen helburua suteek ingurumenean duten eragina aztertzea da, klima-aldaketa hobeto ulertzeko. Aldi berean, ikerketaren amaiera aldera, EHUk ere diruz lagundu zuen doktoretza-beka baten bidez (PIF17/96 kontratu-zenbakia).

Ikerketa honen egile nagusiak Ekhi Roteta eta Aitor Bastarrika bagara ere, Euskal Herriko Unibertsitatekoak, beste hainbatek ere hartu zuten parte: Thomas Stormek Sentinel-2 irudi guztiak deskargatu eta prozesatu zituen, azken produktua lortzeko; Marc Padillak erreferentzia-datuak sortu zituen 45 baliozkotze-eremutan, gero FireCCISFD11 produktua baliozkotuz; eta Emilio Chuviecok prozesu guztia gainbegiratu eta gidatu zuen. Ikerketa osoa artikulu zientifiko batean argitaratu zen (Roteta et al., 2019).

Auxinak induzitutako *degron* (AID) sistemaren garapena funtzio ezezaguna duen proteina baten testuinguruan

García-Aldama, A.[1]*; De la Iglesia, E.[1]*; Fullaondo, A.[1]; Mitxelena, J.[,2] eta Zubiaga, A.M.[1]

[1]Genetika, Antropologia Fisikoa eta Animalien Fisiologia Saila, Zientzia eta Teknologia Fakultatea, Universidad del País Vasco / Euskal Herriko Unibertsitatea (UPV/EHU)
[2]Ikerbasque, Basque Foundation for Science, Bilbo, Bizkaia
**Egile hauen parte-hartzea berdina izan da*
alejandro.garciad@ehu.eus

Laburpena

Auxinak induzitutako *degron* (AID) sistema proteinen kantitatearen murrizketa modu kontrolatuan lortzeko teknologia da, proteinen funtzioa aztertzeko aukera ematen duena. AID sistemari esker, mAID domeinua fusionatuta duten proteinak modu azkarrean degradatu daitezke, auxina molekula gehituz gero. Auxina degradazio sistemaren aktibatzaile gisa erabiltzen da eta sistemaren kontrola ahalbidetzen du. Lan honetan, AID sistema martxan jartzea lortu da *TEDC2* genearen funtzioa ikertzeko asmoz. *TEDC2* endogenoari mAID-mClover3 etiketa gehitu zaio CRISPR/Cas9 teknologia erabilita eta TEDC2-mAID-mClover3 fusio proteina eratu da. TEDC2-mAID-mClover3 zentrioloetan kokatzen dela frogatu dugu, eta auxina gehitzean proteina modu kontrolatuan degradatzea lortu da.

Hitz gakoak: degron, proteinen degradazioa, auxina, genomaren edizioa, TEDC2.

Abstract

Auxin induced degron (AID) system is a technology that allows the conditional depletion of a protein, being particulary useful for the functional analysis of uncharacterised proteins. In cells expressing the OsTIR1 plant protein, it is possible to degrade mAID-fused proteins with a very short half-time in the presence of auxin. In this work, we have successfully developed the AID system using TEDC2 gene as an example, thanks to its tagging with mAID-mClover3 by CRISPR/Cas9. In this way, TEDC2 has turned out to be located in the centrioles and, at the same time, it has been possible to achieve its depletion by the addition of auxin.

Keywords: degron, protein degradation, auxin, genome editing, TEDC2.

1. Sarrera eta motibazioa

Giza Genoma Proiektuari (GGP) esker, gizakiaren genoman 20.000-25.000 gene aurkitu ziren (Naidoo et al., 2011), zelulen funtzionamenduaren eta oinarrizko egituren arduradunak direnak. Aldi berean, GGPak genetzat hartzeko baldintzak betetzen zituzten beste DNA eskualde batzuk identifikatzeko aukera eman zuen, nahiz eta benetako geneak zirenetz jakin ez. Sekuentzia horiek, teorikoki itzuliak izateko potentzialtasuna dutenak, ORF (Irakurtarau Irekia) izenarekin ezagutzen dira. Transkriptomika esperimentuek ORF horien mRNA molekulak identifikatu dituzte eta proteomikakoek ORF horiei dagozkien peptidoak ere, beraz, ORF batzuetarako, froga nahiko daude benetazko gene funtzionalak direla esateko. Hala ere, askoren funtzioa ezezaguna da oraindik.

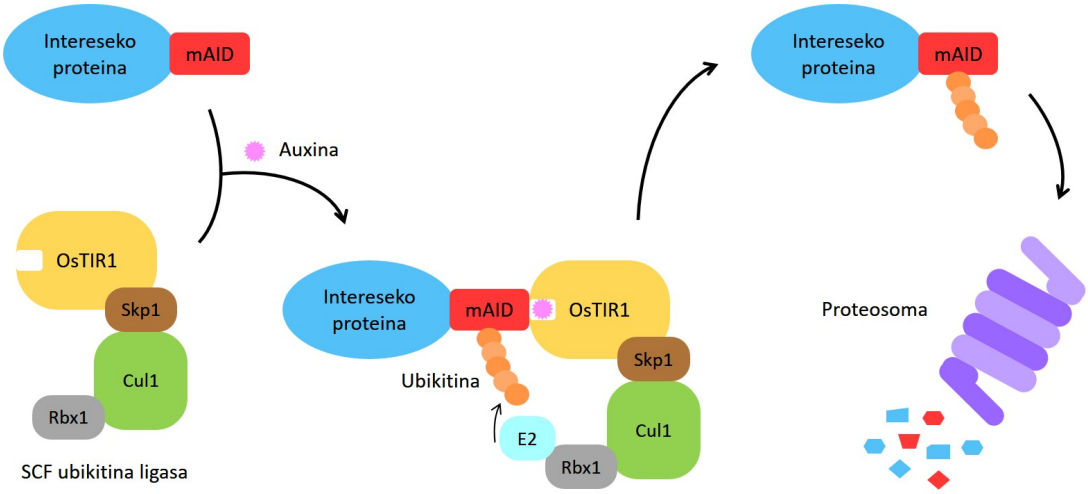
Geneen funtzioa karakterizatzeko gehien erabiltzen den estrategia, genearen isilarazpena da (Alberts et al., 2002). Isilarazpena, orokorrean *knock-down* izenarekin ezagutzen dena, gene produktuak modu itzulgarrian ezabatzeko aukera ematen duen metodologia da. Horrela, isilarazpenaren ondorioz aldatzen den prozesu biologikoak ideia bat ematen digu isilarazitako genearen funtzioaz. Klasikoki interferentziazko RNAk (iRNA) erabili dira geneen adierazpen-maila murrizteko zeluletan aldaketa genetikorik eragin gabe (Agrawal et al., 2003). iRNA molekulen efektua intereseko genearen mRNA degradatzerakoan lortzen da. Denborarekin gene horren produktu proteikoa desagertuko da, proteina sintetizatzeko beharrezkoa den mRNA ez dagoelako. Teknika erraza izan arren, zenbait muga aurkezten ditu: askotan isilarazpen partzialak lortzen dira, *off-target* efektuak gertatzen dira interesekoa ez den genea isalarazten

denean, isilarazpena iragankorra da eta iRNA bide endogenoaren neurriz gaineko aktibazioak albo-ondorioak eragin ditzake (Fellmann eta Lowe, 2014).

iRNA teknikaren mugak gainditzeko asmoz, azken hamarkadetan geneen adierazpena guztiz ezabatzeko teknika berriak agertu dira. Horien artean, *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/CRISPR-Associated Protein-9 nuclease* (CRISPR/Cas9) nabarmentzen da. Genomak editatzeko teknika honek *knockout* deituriko lerro zelularrak sortzeko aukera ematen du, non intereseko genearen adierazpena erabat desagertarazten den (Mali et al., 2013). Hala ere, gene batzuk zelulen bideragarritasunerako funtsezkoak dira edo garrantzi handiko prozesuetan inplikatuta daude, hala nola ziklo zelularrean, eta beraz, ezin daitezke modu iraunkorrean isilarazi (Natsume et al., 2016). Kasu hauetan, proteina kantitatearen murrizketa baldintzatua baliagarria izan daiteke analisi funtzionalak egiteko.

Proteina kantitatearen murrizketa baldintzatua *degron* izeneko domeinu desegonkortzaile bat fusionatuz lor daiteke. Hainbat *degron* domeinu mota daude, modu ezberdinetan kontrolatu daitezkeenak, hala nola, beroa edo molekula txikiak erabilita (Kanemaki, 2013). Existitzen diren *degron* teknologien artean, auxinak induzitutako *degron* (AID) teknologia dago (Nishimura et al., 2009), arrozaren TIR1 (OsTIR1) proteinan eta mini-AID (mAID) izeneko *degron* domeinuan oinarritzen dena (1. irudia). OsTIR1 proteina SCF (Skp1-Cullin-F-box) ubikitina ligasa konplexuaren parte da, eta aktibatzeko auxinaren beharra du. Behin aktibo, mAID domeinua duten proteinetara lotu eta poliubikitinatu ondoren, proteosomara bideratuko ditu, bertan degradatuak izan daitezen. Hortaz, intereseko proteinari mAID domeinua fusionatuko balitzaio, posiblea litzateke modu induzigarri, itzulgarri eta azkarrean proteina ezabatzea, 10-20 minutuko bataz besteko bizitzarekin (Holland et al., 2012).

1. irudia. AID sistemaren funtzionamendua. Auxina dagoenean, SCF ubikitina ligasak mAID domeinua duten proteinak poliubikitinatuko ditu, ondoren proteosoman degradatuko direnak.



Lan honen helburua AID sistema martxan jartzea da, funtzio ezezaguneko proteina bat aztertzeko asmoz. Adibide bezala, *TEDC2* (Tubulina Epsilon eta Delta Konplexu 2) genea aukeratu da, lehenago *C16orf59* deiturikoa. Momentuz, informazio gutxi dago ORF honi buruz, bakarrik dakigu gainadieraztean zentrioloetan kokatzen dela eta bere *knockout*-ak zentrioloetako ezegonkortasuna eragiten duela (Breslow et al., 2018).

AID sistemak TEDC2rekin arraskasta izanez gero, metodologia klasikoen bitartez aztertzeko zailak diren funtzio ezezaguneko ORFak karakterizatzeko ate berri bat irekiko litzateke.

2. Arloko egoera eta ikerketaren helburuak

Lan honen helbururik garrantzitsuena ORF baten funtzioa aztertu ahal izateko AID sistema martxan jartzea da. Kasu honetan, *TEDC2* genearen produktu endogenoa fluoreszentziarekin markatuko da. Aldi berean, *TEDC2* endogenoa mAID domeinuarekin fusionatuko da degradazio induzigarria eta itzulgarria lortzeko. Artikulu honetan AID sistemaren garapenerako

metodologia zehatza azalduko da, beharrezkoak diren zelulen lorpenarekin hasita, sistemaren funtzionamendua ziurtatzeko analisietara iritsi arte. Gainera, *TEDC2* endogenoaren kokapen zelularra zehaztuko da.

3. Ikerketaren muina

3.1. DLD1 OsTIR TEDC2-mAID-mClover3 zelulen lorpena CRISPR/Cas9 erabiliz

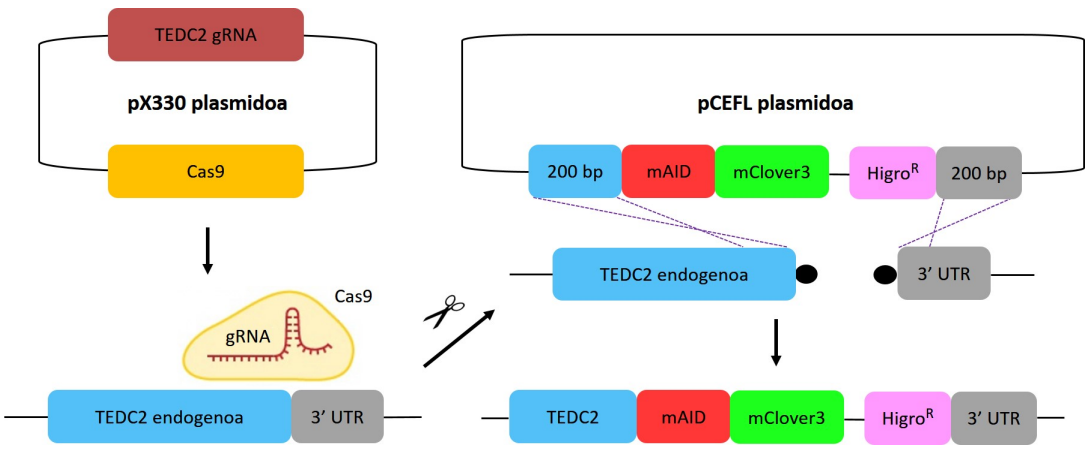
AID sistema martxan jartzeko, jadanik OsTIR1 transgenea genoman sartuta zuten DLD1 zelulak aukeratu ziren. Zelula hauek ondesteko minbizi batetik eratorritako giza-zelulak dira, kariotipo egonkorra mantentzeagatik nabarmentzen direnak.

mAID domeinua TEDC2 proteinari fusionatu ahal izateko, CRISPR/Cas9 erabili zen. Horretarako, gRNA molekula bat diseinatu zen, TEDC2ren amaierako kodoiaren alboan kokatzen den sekuentzia batekiko osagarria. BbsI murrizketa-entzima erabilita, gRNA hori, Cas9 entzima kodetzen duen pX330 plasmidoaren barruan txertatu zen.

Plasmido horrez gain, bigarren plasmido bat ere diseinatu zen CRISPR/Cas9 sisteman erabiltzeko. Bigarren plasmido horretarako, TEDC2ren amaierako kodoitik ur gora eta ur behera dauden 200 nukleotidoak aukeratu ziren, pCEFL plasmidoaren barruan sartu zirenak AgeI eta NotI murrizketa-entzimak erabilita. Hurrengo pausua, mAIDren sekuentzia kodetzailea pCEFL plasmidoan sartzea izan zen. Horretarako, intereseko DNA egitura PCR bidez klonatu zen, mAID domeinuaz aparte beste bi elementu zituena: mClover proteina fluoreszentearen genea eta higromizinarekiko erresistentzia-genea. Lortutako DNA sekuentzia (mAID-mClover3-Higro^R) pCEFL plasmidoaren barruan sartu zen BamHI murrizketa-entzima erabilita.

Behin klonazioekin amaituta, DLD1-OsTIR1 zelulak diseinatutako bi plasmidoekin (pX330 eta pCEFL) transfektatu ziren (2. irudia). Modu horretan zera espero da, pX330 plasmidotik transkribatutako gRNAk, Cas9 entzima *TEDC2*ren azken exoira gidatzea, eta entzimak DNAa moztea. Sortutako bi muturrak berriro lotzeko, eta beraz, DNA egitura konpontzeko, zelulak pCEFL plasmidoa erabiliko luke txantiloi gisa, bere baitan *TEDC2*ren azken 200 nukleotidoak eta 3'UTRaren (*untranslated region*) lehenengo 200 nukleotidoak baitaude. Konponketaren ondorioz mAID-mClover-Higro^R etiketa *TEDC2* genearen atzean ezarriko litzateke, horrela fusio-proteina bat sortuz, TEDC2-mAID-Clover-Higro^R, hau da, *TEDC2* gene etiketatua, eta baita higromizinarekiko erresistentzia ematen duen genea ere. Transformatutako zelulen hautespena burutzeko, zelulak higromizinarekin tratatu ziren (100µg/ml). *TEDC2* genea etiketatua zuten zelulak antibiotikoarekiko erresistenteak izango lirateke eta beraz horiek soilik haziko lirateke. DLD1 zelulak diploideak direnez, biziraun dezaketen zelulak bi motatakoak izan daitezke: homozigotoak (*TEDC2*ren alelo biak etiketa daramatenak) edo heterozigotoak (alelo bakarra etiketatua eta bestea alelo basatia dutenak).

2. irudia. DLD1 OsTIR1 zelulak eraldatzeko erabilitako CRISPR/Cas9 sistema. gRNAk TEDC2ren azken exoira gidatuko du Cas9 bertan mozteko. Sortutako kaltea konpontzeko, zelulak pCEFL plasmidoa erabiliko du txantiloi gisa eta mAID-mClover3-Higro^R *TEDC2*ren ostean sartuko da.

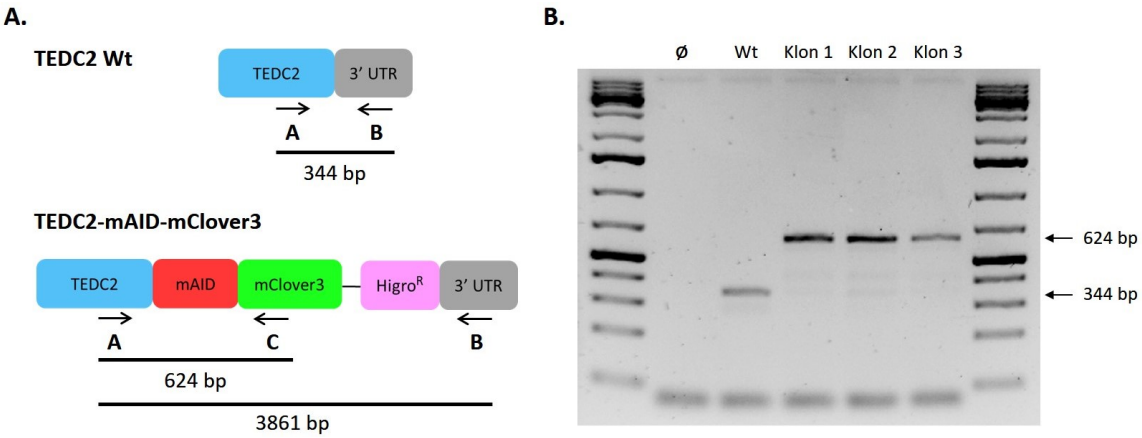


Zelula homozigotoen kopurua aberasteko asmoz erabili zen estrategia ondorengoa izan zen: Zelula homozigotoek *TEDC2* alelo biak etiketatuta dituztenez, espero da beraien mClovererrek ematen duen fluoreszentzia-seinalea bikoitza izatea. Beraz, fluoreszentzia-seinale handia duten zelulak aukeratuz, zelula horiek homozigotoak izateko aukerak emendaturik daude. Achucarro zentroko *Cell Sorting* zerbitzua erabiliz, fluoreszentzia-seinale berde altuena zuten zelulak aukeratu ziren. Zelula horietatik hasita mugako-diluzio bat burutu zen 96-putzuko plaketan, hau da, putzuko zelula bakarra ereinik. Zelulak bi astez utzi ziren hazten eta zelula-kopuruak handitu ahala plaka handiagoetara pasatu ziren.

3.2. PCR bidezko klonen karakterizazioa

Gehien hazi ziren klonak karakterizatzeko, haien DNA genomikoa DirectPCR (Viagen Biotech) izeneko lisi tanpoiarekin eta K proteinasa (0,4 mg/ml) gehituz erauzi zen, 55ºC 6h eta 85ºC 45min inkubazio-denborak erabiliz. Behin DNA genomikoa erauzita, PCRa burutu zen hiru hasle ezberdinekin: "A", *TEDC2*ren azken exoira lotzen dena; "B", *TEDC2*ren 3'UTRarekiko osagarria dena; eta "C", mClover sekuentziara lotzeko gai dena (3A. irudia). Hortaz, zelula batek *TEDC2* genea etikatuta badauka, "A" eta "C" hasleek 624 base-pareko (bp) PCR produktu bat emango lukete. Berriz, *TEDC2* basatia kontserbatzen duten zeluletan, "A" eta "B" hasleak erabilita, 344 bp-ko banda bat anplifikatuko litzateke. Printzipioz, "AB" hasleek badute etiketatutako *TEDC2* geneari lotzeko gaitasuna, baina PCRan ez da anplifikaziorik lortzen orokorrean, produktua handiegia delako (3861bp).

3. irudia. Klonen DNArekin burututako PCRa. A. TEDC2 basatia (Wt) eta TEDC2-mAID-mClover3 bereizteko diseinatutako hasleak eta horiekin esperotako anplikoiak. B. Etiketarik gabeko DLD1 zeluletan (Wt) TEDC2 basatiaren banda (344bp) bakarrik agertzen den bitartean, aukeratutako hiru klonek 624bp-ko banda aurkezten dute, eta beraz, TEDC2-mAID-mClover3 fusio-proteinarako homozigotoak dira.



PCR erreakzioa aurrera eramateko ondoko baldintzak erabili ziren: 50ng DNA genomiko, 0,2µM "A" haslea, 0,3µM "B" haslea, 0,1µM "C" haslea, 0,5mM dNTPak, 50mU/µl DreamTaq polimerasa (Thermo Fisher), Taq polimerasa tanpoia (20mM Tris-HCl pH 8,4, 50mM KCl), 0,5mM $MgCl_2$ eta 0,13M betaina; 50µl-tan. Anplifikazioa burutzeko Veriti Thermal Cycler (Applied Biosystems) termozikladorea erabili zen 30 zikloz: 95ºC 1min, 60ºC 1min eta 72ºC 40s-ko baldintzak erabilita. Kontrol gisa, jatorrizko DLD1 OsTIR1 zeluletatik erauzitako DNA genomikoa eta DNArik gabeko laginak erabili ziren.

Anplifikatuak %1,5 agarosadun geletan migratu ziren (3B. irudia). Espero bezala, DNArik gabeko kontrol negatiboak (Ø) ez zuen inolako bandarik aurkeztu, kutsadurarik ez egotearen seinale. Bestalde, eraldatu gabeko DLD1 OsTIR1 zelulek *TEDC2* alelo basatiaren banda baino ez zuten aurkeztu (344bp). Hortaz, erabilitako bi kontrolak esperotako emaitza eman zuten. Aztertutako zelula-klon guztiek 624bp-ko banda erakutsi zuten, CRISPR/Cas9 teknikaren bitartez etiketa gehituta zutenaren froga. Gainera, 344bp-ko banda aurkeztu ez zutenez, homozigotoak direla ondorioztatu genuen, hau da, *TEDC2*ren bi aleloek mAID-mClover3-Higro^R etiketa zutela.

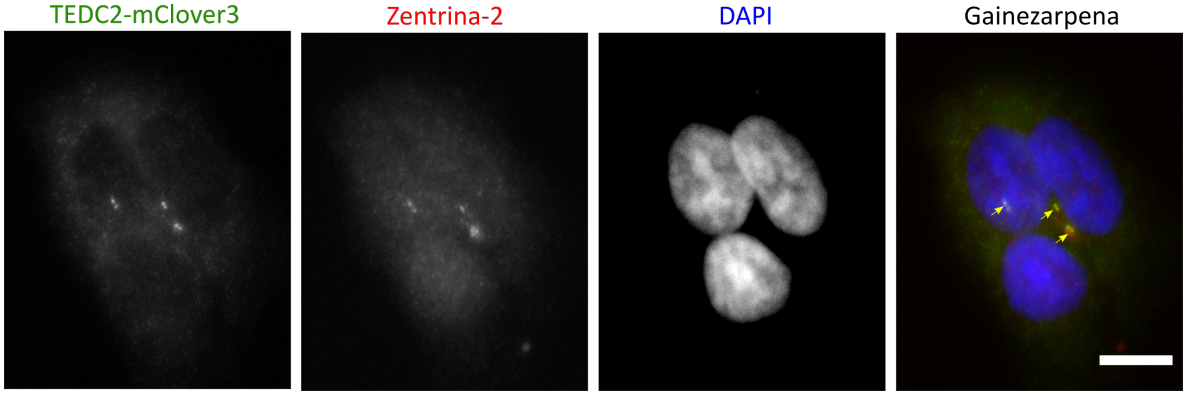
Emaitza hauek sistema prest zegoela adierazi zuten. Honek ahalbidetuko luke bai TEDC2ren kokapena finkatzea eta bai klon hauei auxina gehituz gero, TEDC2ren degradazioa bultzatzea.

3.3. TEDC2-mAID-mClover3ren kokapenaren eta degradazioaren azterketa fluoreszentziako mikroskopia erabilita

TEDC2 proteinaren kokapen zelularra ikuskatzeko, zelulak mikroskopioan behatzeko prestatu ziren. TEDC2 endogenoa mClover3-rekin markatuta zegoenez mClover detektatzen zuen antigorputza erabili zen tindaketan. Zelulak -20ºC metanolarekin fixatu ziren 5minutuko izotz inkubazioarekin, zitoeskeletoaren egitura zuzena mantentzeko. Fixatu ondoren, zelulak ordu batez blokeatu ziren %3 BSA zuen PBStan. Blokeatu eta gero, immunofluoreszentzia tindaketarako bi antigorputz erabili ziren, anti-GFP (PABG1; Chromotek), mClover3 detektatzen zuena, eta anti-Zentrina-2 (04-1624; Millipore), zentrioloen mutur distalaren markatzailea dena. Antigorputzak ordubetez inkubatu ziren, eta ondoren antigorputz sekundarioekin inkubazio berdina egin zen. Kasu honetan anti-sagu-AlexaFluor594 (Invitrogen) eta anti-untxi-AlexaFluor488 (Invitrogen), zentrina eta mClover3 tindatzeko, hurrenez hurren. Mikroskopiorako muntaketa egiteko VectaShield-DAPI (VectorLabs) erabili zen. Laginak Nikon Eclipse E400 fluoreszentzia-mikroskopioarekin aztertu ziren.

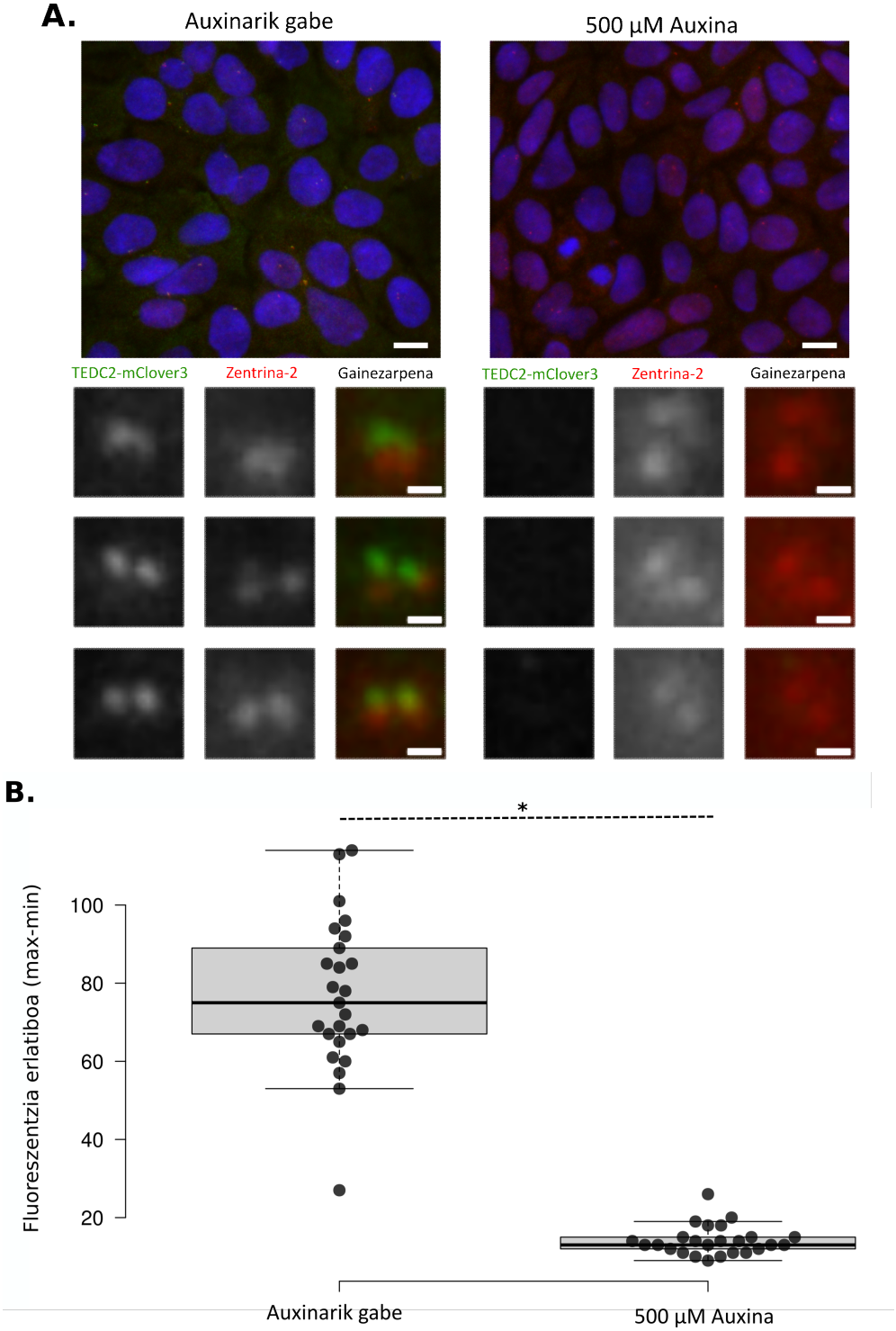
Mikrografietan seinale berdea (TEDC2 seinalea) eta gorria (zentrina-2 seinalea) batera ikusten ziren (4. irudia). Hortaz, TEDC2 endogenoa, ordura arte ez zena inoiz ikusi (antigorputzik ez baitago), zentrioloetan kokatzen zela frogatu ahal izan zen; etiketa fluoreszente batekin gainadieraztean ikusi zen bezala (Breslow et al., 2018). Hala ere, zentrinaren eta TEDC2ren arteko kolokalizazioa partziala baino ez zen, TEDC2k zentrinak baino kokapen proximalagoa zuela zirudielako, zentrina zentrioloen atal distalean aurkitzen den proteina baita. Beraz, TEDC2 zentrioloen atal proximalean kokatzen dela ondorioztatu daiteke. Gainera, zentriolo bikote osoa berdez ikusteak adierazten du TEDC2 kokatzen dela ama eta alaba diren zentriolo parean.

4. irudia. TEDC2 endogenoa zentrioloetan kokatzen da. Argazkiak 40x handipenarekin atera ziren: 600ms esposizioarekin kanal berdea, 600ms gorria eta 10ms urdina. Eskala-barra: 10µm. Gezi horiek zentriolo bikoteak nabarmentzen dituzte. TEDC2k zentrinak baino kokapen proximalagoa dauka ama eta alaba zentrioloetan.



Auxinak induzitutako TEDC2ren murrizketa aztertzeko, mikroskopiako esperimentua errepikatu zen. Kasu honetan bi lagin jarri ziren, bata auxinarik gabe eta bestea 500µM auxinarekin, eta 24 ordu ondoren, mikroskopiako prestaketa egin zen. Lagin bi hauen analisirako baldintza berdinak erabili ziren (600ms-tako esposaketa eta 4.5 *gain*). Emaitza argia zen: TEDC2 endogenoa guztiz degradatzen zen auxina gehitzerakoan, seinale berdea ia osorik desagertzen zelako (5A. irudia). Hortaz, AID sistema TEDC2 zentrioloetatik oso modu eraginkorrean degradatzeko gai da. Grafikoan (5B. irudia) ikusten den moduan (Fiji softwararen bidezko fluoreszentziaren kuantifikazioa erabiliz), auxinak kontroleko hondo-zarataren pareko maila batera jaisten du TEDC2ren seinalea.

5. irudia. Auxina gehitzean TEDC2 endogenoa degradatzen da. A. 40x handipenarekin ateratako argazkiak: 600ms esposizioarekin kanal berdea, 600ms gorria eta 10ms urdina. Eskala-barra: 10µm; *zoom*-a 600nm. B. Seinale berdearen intentsitatea hondo-zarataren aurka.



Emaitza hauetatik atera daitekeen ondorio nagusia ondokoa da: ezezaguna den edozein proteina endogeno CRISPR/Cas9 erabiliz markatu daiteke, eta gainera, mAID-rekin etiketa izanik, modu eraginkorrean eragin daiteke bere degradazioa.

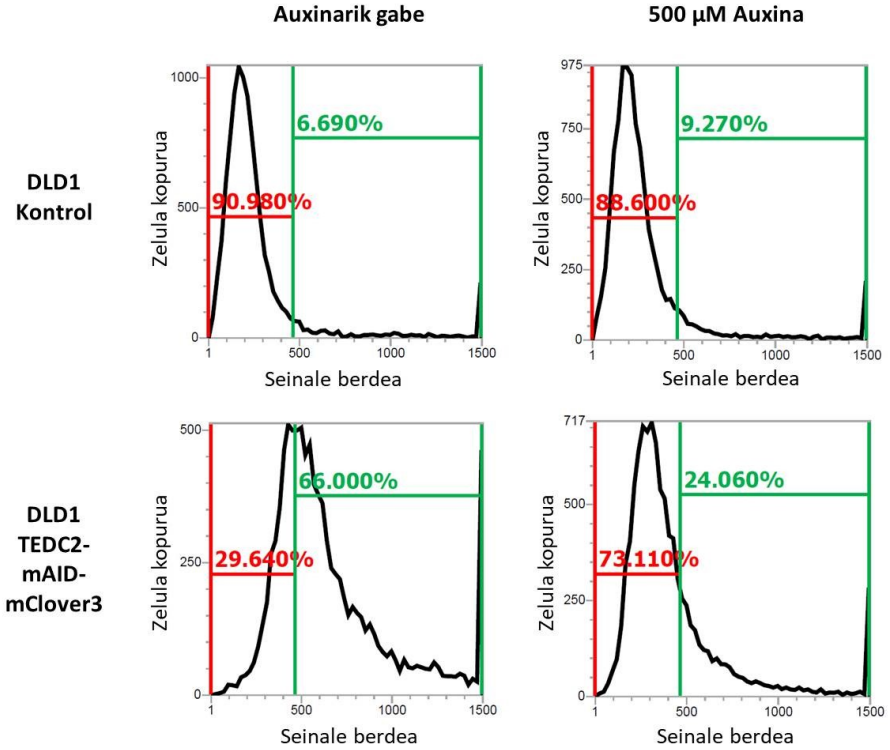
3.4. TEDC2-mAID-mClover3ren degradazioaren baieztapena fluxu-zitometroaren bitartez

Mikroskopiazko analisiaz gain, AID sistemaren efizientzia fluxu-zitometroaren bitartez frogatu zen ere (6. irudia). Horretarako, eraldatu gabeko DLD1 OsTIR zelulak (kontrola) eta

TEDC2 etiketatuta zuten zelula monoklonal homozigotoak plakeatu ziren, bi putzu bakoitzeko. Horietako batean 500µM auxina gehitu zen, beste putzuan tratamendurik ez. 24h geroago, zelulak %70 etanoleko PBStan fixatu ziren 4ºC-tara. 10 minutuko inkubazioa eta gero, Attune NxT Flow (Invitrogen/Thermo Fisher) zitometrotik pasatu ziren, laserrak seinale berdea detektatzeko (λ_{ex}: 488 ± 5 nm) baldintzak erabiliz. Guztira, $2x10^4$ zelula inguru aztertu ziren.

Kontrolean, zelulen %6,69-ak fluoreszentzia berdearen seinale positiboa agertzen zuen, eta auxina gehitzerakoan antzera mantendu zen portzentajea (%9,27 positiboak). DLD1 OsTIR TEDC2-mAID-mClover3 zeluletan, ordea, seinale berdea %66,00-ra igo zen, etiketa fluoreszentea edukitzearen ondorio. Gainera, zelula hauek auxinarekin tratatzean seinale berdearen galera handia nabaritu zen, %24,06ra jaitsi baitzen, kontrolean gertatzen ez zena. Hortaz, auxinak TEDC2-mAID-mClover3ren proteinaren mailaren degradazioa eragiten du modu nabarmenean, mikroskopiako emaitzekin bat datorrena.

6. irudia. DLD1 TEDC2-mAID-mClover3 zelulen seinale berdea % 66,00-tik % 24,06-ra murrizten da auxinarekin, kontrolean ezberdintasunak askoz txikiagoak izanda.



4. Ondorioak

AID sistema, CRISPR/Cas9rekin batera, oso tresna erabilgarria da edozein generen funtzioa aztertzeko. Izan ere, funtzio ezezaguneko ORFak karakterizatzeko abantaila asko aurkezten ditu, besteak beste:

- Gene endogenoa proteina fluoreszente batekin markatzen bada, modu erraz batean detektatu daiteke.
- mClover3ren (edo beste etiketa fluoreszente baten) seinalea mikroskopiarekin eta zitometroarekin detektagarria da, eta horrek analisi funtzionalen azterketa errazten du.
- Lortutako proteinaren degradazioa espezifikoa eta azkarra da eta, CRISPR/Cas9 *knockout*-ak ez bezala, induzigarria eta itzulgarria ere.

Lan honen bitartez, AID sistemak ORFak aztertzeko balio duela frogatu da lehenengo aldiz. Bestalde eta adibide bezala, TEDC2 proteina endogenoaren kokapen fisiologikoa zentrioloak direla frogatu da, gainadierazpenarekin aurkitu zen berdina (Breslow et al., 2018).

5. Etorkizunerako planteatzen den norabidea

TEDC2rekin jarraituz, etorkizuneko lan batean proteina horren funtzioa zein den ikertu beharko litzateke, baita zer nolako erlazioa daukan zentrioloen egonkortasunarekin. Interesgarria izango litzateke TEDC2ren degradazioaren zinetika bat egitea epe labur eta luzean, proteina horren faltak denboran zehar eragiten duen fenotipoa aztertzeko. Era berean, ziklo zelularrean zehar zer nolako erregulazioaren menpe dagoen ikertu daiteke. Bestalde, TEDC2k parte-hartzen duen bidezidorra zehazteko, bere interaktoreak ezagutzea lagungarria izan liteke, *GFP-Trap* bidezko mClover3-ren immunoprezipitazioarekin eta masa espektrometroarekin proteomika esperimentua eginez zehaztu litezkeenak. Azkenik, behin AID sistema optimizatuta, edozein ORF klona liteke TEDC2rekin burututako antzeko azterketa sakona eta zehatza egiteko.

6. Erreferentziak

Agrawal, N., Dasaradhi, P. V. N., Mohmmed, A., Malhotra, P., Bhatnagar, R. K. eta Mukherjee, S. K. (2003): RNA interference: biology, mechanism and applications, *Microbiology and Molecular Biology Reviews,* 67(4), 657-685.

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. eta Walter, P. (2002): *Molecular biology of the cell,* Garland Science, New York.

Breslow, D. K., Hoogendoorn, S., Kopp, A. R., Morgens, D. W., Vu, B. K., Kennedy, M. C., Han, K., Li, A., Hess, G. T., Bassik, M. C., Chen, J. K. eta Nachury, M. V. (2018): A CRISPR-based screen for Hedgehog signaling provides insights into ciliary function and ciliopathies, *Nature Genetics,* 50(3), 460-471.

Fellmann, C. eta Lowe, S. W. (2014): Stable RNA interference rules for silencing, *Nature Cell Biology,* 16(1), 10-18.

Holland, A. J., Fachinetti, D., Han, J. S. eta Cleveland, D. W. (2012): Inducible, reversible system for the rapid and complete degradation of proteins in mammalian cells, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(49), E3350-3357.

Kanemaki, M. T. (2013): Frontiers of protein expression control with conditional degrons, *Pflugers Archive: European Journal of Physiology*, 465(3), 419-425.

Mali, P., Yang, L., Esvelt, K. M., Aach, J., Guell, M., DiCarlo, J. E., Norville, J. E. eta Church, G. M. (2013): RNA-guided human genome engineering via Cas9, *Science*, 339(6121), 823-826.

Naidoo, N., Pawitan, Y., Soong, R., Cooper, D. N. eta Ku, C. (2011): Human genetics and genomics a decade after the release of the draft sequence of the human genome, *Human Genomics*, 5(6), 577-622.

Natsume, T., Kiyomitsu, T., Saga, Y. eta Kanemaki, T. (2016): Rapid protein depletion in human cells by auxin-inducible degron tagging with short homology donors, *Cell Reports*, 15(1), 210-218.

Nishimura, K., Fukagawa, T., Takisawa, H., Kakimoto, T. eta Kanemaki, M. (2009): An auxin-based degron system for the rapid depletion of proteins in nonplant cells, *Nature Methods*, 6(12), 917-922.

7. Eskerrak eta oharrak

DLD1 OsTIR1 zelulak Daniele Fachinettiren eskutik lortu ditugu. Ana María Zubiagak Espainiako Jaurlaritzako (Ministerio de Ciencia e Innovación RTI2018-097497-B-I00) eta Eusko Jaurlaritzako (Hezkuntza Saila. Erref.:IT1257-19) dirulaguntzak jaso ditu. Alejandro García-Aldama Eusko Jaurlaritzako doktoretza aurreko dirulaguntza baten jabea da (PRE 2020) eta Endika De La Iglesiak Espainiako Jaurlaritzako doktoretza aurreko dirulaguntza jaso du (FPU 2017). Jone Mitxelenak Ikerbasque *research fellow* (2020) doktoretza ondoko kontratua dauka.

Kannabinoideak pilula gisa: enkapsulazio egonkorra posible ote?

Villate, A., Delgado, I., Olivares, M., Etxebarria, N. eta Usobiaga, A.
Kimika Analitikoa Saila (Euskal Herriko Unibertsitatea, Leioa, Euskal Herria)
aitor.villate@ehu.eus

Laburpena

Cannabis Sativa L. landare espeziean aurkitzen diren kannabinoideek interes handia piztu dute medikuntzan, batez ere, zenbait gaixotasun kronikoren sintomei aurre egiteko duten ahalmen terapeutikoa dela eta. Kannabis terapeutikoa administrazio-bideen eta produktuen artean, kannabinoideen enkapsulazioa aukera ona dirudi, osasunerako kaltegarria ez den, dosifikatzeko erraza den eta kannabinoideak ingurunetik babesten dituen metodoa delako. Lan honetan, *Vibration Nozzle Microencapsulation* teknikaz egindako kannabis kapsulen egokitasuna aztertuko da, bi formulazio desberdinekin lortutako kapsulak beraien artean erkatuz.

Hitz gakoak: Kannabisa, kannabinoideak, enkaspulazioa, alginatoa, chitosana

Abstract

The plant species Cannabis Sativa L. has gained popularity in medicine, particularly, because of its therapeutic strength to face the symptoms of certain chronic illnesses. Within the diverse administration routes and products for consuming therapeutic hemp, encapsulation of cannabinoids seem to be a proper option; as it is not harmful for the patient's health, it is easy to be dosed and protects cannabinoids from environment. In this work, the suitability of cannabis capsules made with Vibration Nozzle Microencapsulation technique will be evaluated, by comparing two different formulations of making them.

Keywords: Cannabis, cannabinoids, encapsulation, alginate, chitosan

1. Sarrera eta motibazioa

K.a. 3000. urtean, Shennong enperadoreak lehen txinatar farmakopean *Cannabis Sativa L.* landarearen erabilera deskribatu zuen, nekeari, erreumatismoari eta malariari aurre egiteko tratamendu bezala (Bonini et al., 2018). Arrez geroztik, kannabisaren ahalmen terapeutikoa historian zehar hedatu izan da; aintzinako greziar eta erromatar inperioaren gizarteetatik igarota, gaur egungo Covid-19-ari aurre egiteko tratamendu bezala proposatua izan arte (Wang et al., 2020; Śledziński et. al, 2021). Kultura askotan, landare sakratu bezala erabilia izan da; eta gaur egun askok bere ahalmen medizinal magikoetan sinisten dute, beste askok bere erabilera eszeptizismo handiarekin begiratzen duten bitartean. Errealitatea, izan ohi den bezala, bi ikuspuntuen artean dago.

Kannabis terapeutikoaren erabilerak, garrantzi handia dauka gaixotasun kronikoen esparruan. Esaterako, zenbait gaixotasunen min kronikoa eta esklerosi anizkoitza tratatzeko eraginkorra dela ikusi da, eta jangura estimulatzaile bezala erabiltzen da anorexia, HIESa edo minbizia duten gaixoetan (Whiting, 2015; Bonini et. al, 2018; Śledziński et. al, 2021). Minbizien kasuan, aurrekoaz gain, kimioterapiak eragiten dituen goragaleak ekiditeko erabili izan da eta ohiko minbiziaren aurkako farmakoekin efektu sinergikoa sortzen duela ikusi da zenbait kasutan (Śledziński et. al, 2021).

Antsietatea, depresioa, Touretten Sindromea eta loezina tratatzeko erabiltzen da, eta hainbat ikerketa egin dira honen inguruan, baina ikerketa hauei sendotasun falta izatea leporatzen zaie gaur egun (Whiting, 2015; Śledziński et. al, 2021). Covid-19-aren kasuan, ahoa garbitzeko kannabisean oinarritutako produktuak prebentzio neurri bezala erabili daitezke (Wang et. al, 2020) eta bere ahalmen antiinflamatorioa lagungarria izan liteke sintomei aurre egiteko; baina kannabisak birusaren ostalariaren erantzun immunea gutxitu dezakeenez (birusaren propagazioa erraztuz), ez da koronabirusari aurre egiteko gomendatzen momentuz (Śledziński et. al, 2021).

Landare honek hainbeste gaitz tratatzeko gai izatearen erantzulea giza gorputzean dagoen sistema endokannabinoidea da. Sistema endokannabinoidea (SE), zenbait lipido neuromodulatzaileek (endokannabinoideak) eta hauekiko espezifikotasuna duten errezeptoreek osatzen dute. Errezeptore hauek gorputz osoan zehar sakabanatuta daude eta gosea, memoria, garapen neurologikoa, minaren

sentsazioa, estresa, inflamazioa, ugalkortasuna eta beste hainbat prozesu biologiko eta psikologiko erregulatzen dituzte (Aizpurua-Olaizola et. al, 2017).

Cannabis Sativa L. landareak, kannabinoide deritzen eta SE-aren errezeptoreekiko afinitatea duten konposatu terpenofenolikoak ekoizten ditu bere hazkuntzan. Orain arte, 120 kannabinoide desberdin identifikatu dira kannabisean, baina ospe handiena dutenak tetrahidrokannabinola (THC) eta kannabidiola (CBD) dira (ElSohly et. al, 2017). Kannabinoide bakoitzak afinitate desberdina du SE-aren errezeptoreekiko, eta ondorioz gorputzean eragiten duen efektua desberdina da. Esaterako, THC kannabisaren efektu psikotropikoen erantzulea da, eta horregatik, azken urteotan efektu psikotropikoak eragin gabe propietate terapeutikoak dituen CBD nagusitzen hasi da (Aizpurua-Olaizola et. al, 2017).

Kannabisean oinarritutako produktuek medikuntzan etorkizuna baldin badute ere; hainbat herrialdetan dauden lege-auziak alde batera utzita, hiru erronka nagusiri aurre egin behar diete: administrazio-bidea, dosifikazioa eta kannabinoideen egonkortasuna.

Kannabinoideen kontsumo-bide ohikoenak kannabisa erretzean eta baporatzean datzate, metodo sinpleak eta eskuragarriak direlako; baina osasunarentzat oso kaltegarriak izan daitezke. Horregatik hauen aurrean, bide topikoaz edo ahoaz hartutako produktuak nagusitzen hasi dira, hala nola, kremak, olioak eta kannabisaren eratorriak dituzten zenbait elikagai (Russell et. al, 2018).

Kannabis produktuen erabilpen terapeutikoa egokia izateko, kannabinoideen dosia pertsona eta gaitz bakoitzari egokituta egon behar da. Kannabinoideen dosifikazio aproposa bermatu ahal izateko, kannabis produktuen ezaugarritzea beharrezkoa da analisi kimikoen bitartez. Izan ere, landarearen azpiespeziearen eta hazkuntza baldintzen arabera, kannabinoideen konposizioa zeharo desberdina izan daiteke (Burgel et. al, 2020), eta, aplikazio terapeutikoaren arabera, kannabinoide batzuk edo beste batzuk izatea faboratuko da (Aizpurua-Olaizola et. al, 2017). Kannabinoide bakoitzaren kantitatea ezagutzeko, landarean bertan edo eratorritako produktuetan, gas kromatografian edo likido kromatografian oinarritutako analisi-metodoak erabiltzen dira (ElSohly et. al, 2017).

Bestalde, kannabinoideak, THC bereziki, oxidazioarekiko, beroarekiko eta argiarekiko sentikorrak dira, eta inguruko faktore hauek kannabinoideen degradazioa eragin dezakete (ElSohly et. al, 2017; Carbone et. al, 2010). Kannabis produktuak ekoizten direnean, beraz, kannabinoideei babesa ematen dioten matrizeak bilatu behar dira.

Testuinguru honetan, kannabis produktuak ekoizteko orduan, kannabinoideen enkapsulazioa aukera aproposa izan daiteke. Aho bidetik kontsumitzen den produktua da kapsula, zeinaren produkzioa eta analisia estandarizatu daitekeen, dosifikazioa erraztuz. Era berean, kannabinoideak ingurunetik babesteko gai izan daiteke matrize hau.

2. Arloko egoera eta ikerketaren helburuak

Gaur egun kannabinoideak enkapsulatuta dituzten produktuak salgai daude merkatuan. Haien artean ezagunena dronabinola da, Marinol® izenarekin 1986an merkaturatu zen farmakoa, kimioterapiaren goragaleei eta jateko gogo ezari aurre egiteko. Farmako hau THC sintetikoa sesamo olioan disolbatuz eta gelatinatan enkapsulatuz prestatzen da (Hazekamp et. al, 2013). Honetaz gain, poli-Ɛ-kaptrolaktona mikropartikulak erabiliz CBD purua enkapsulatu izan da aplikazio antitumoralentzat (Pérez de la Ossa et. al, 2012) eta kannabinoide sintetikoak lipido-eramaile nanoegituretan ere enkapsulatu dira (Esposito et. al, 2016). Produktu hauek ordea, desabantaila bat dute, kannabinoide sintetikoetatik edo puruetatik prestatzen dira.

Kannabis produktu bat prestatzerako orduan, kannabinoide desberdinak izateaz gain, kannabisean aurkitzen diren terpenoak egotea interesgarria izan daiteke. Izan ere, zenbait ikerketetan ikusi da terpeno hauek kannabinoideekin batera efektu sinergikoa eragin dezaketela (Aizpurua-Olaizola et. al, 2017).

Kannabinoideen enkapsulazioa aurrera eramateko beste aukera bat, landareen erauzkinetatik abiatuta enkapsulazioa ahalbidetzen duen alginatoa eta *Vibration Nozzle Microencapsulation* (VNM) deritzon teknika erabiltzea da. Prozedura honen bidez mahats hondakinetatik erauzitako polifenolak arrakastarekin enkapsulatu izan dira, eta inguruneak eragindako degradaziotik nolabait babestuta geratu direla ikusi da (Azipurua-Olaizola et. al, 2016).

Aurrekoa kontuan hartuta, lan honetan kannabinoideen enkapsulazioa aurrera eraman da; kannabis-erretxina batetik abiatuta eta alginato-VNM teknika erabilita. Enkapsulazio-prozesuaren eraginkortasuna eta egokitasuna ebaluatzeko, kannabis kapsulen zahartzea aztertu da 6 hilabeteetan zehar baldintza desberdinetan, 4 kannabinoideen kontzentrazioaren eboluzioa aztertuz. Alginatoarekin egindako kapsulak gogortzeko kaltzioa erabili ohi da, baina horretaz gain chitosan deritzon beste polimero bat erabili daiteke kaltzioarekin batera, babes gehigarria ematen diona. Hau kontuan hartuta, bi kapsula mota ekoiztu dira, alginato eta alginato-chitosan; eta bien zahartzearen konparaketa aztertu izan da, formulazio egokiena aukeratzeko asmoarekin.

3. Ikerketaren muina

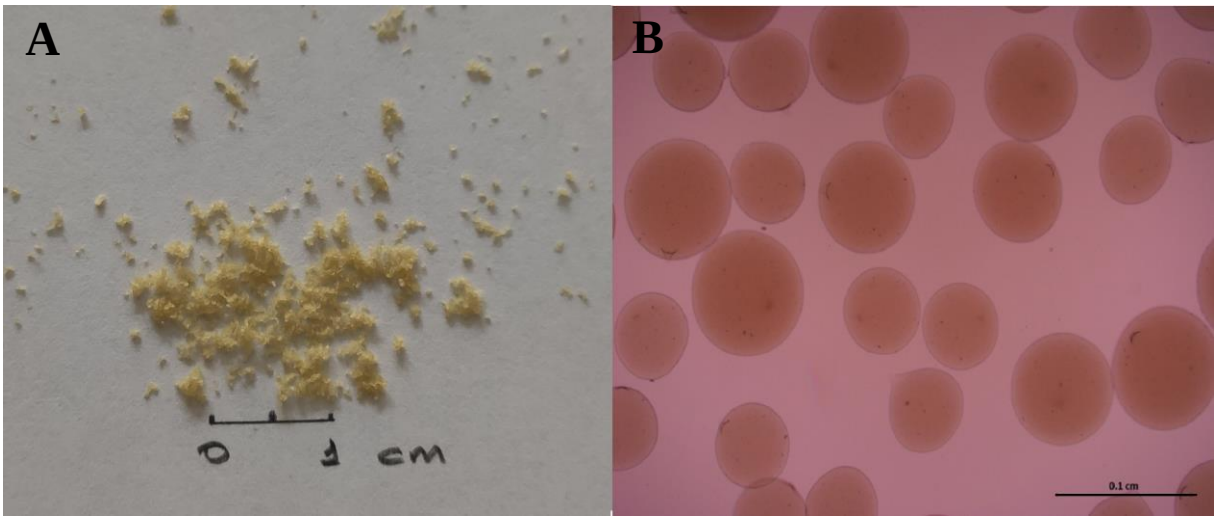
3.1. Kapsulen prestaketa

Kapsulak prestatzeko Fundacion Renovatio-k emandako kannabis erretxina baten 2 g erabili dira. Alginato kapsulak prestatzeko, konposatu bioaktiboa eta alginatoa uretan disolbatzearekin nahikoa izan ohi da; baina kannabinoideak uretan disolbagaitzak direnez, *Cannabinoids Formulations* US 8808734 B2 patentean adierazitako prozedura jarraitu da erretxina-alginato disoluzioa prestatzeko.

Behin disoluzio hau prestatuta Buchi B-390 enkapsuladorera eraman da, eta 300 µm-ko diametroko zirrikitua erabiliz, presioa 120-130 mbar, boltaia 600 V-tan eta maiztasuna 500 Hz-tan finkatu dira. Ondoren kapsulak gogortzeko bi disoluzio erabili dira, alde batetik 0.2 M-ko $CaCl_2$ disoluzio bat, eta, bestetik 0,2 M $CaCl_2$ eta % 0,05 chitosan den disoluzio bat.

Behin kapsulak gogortuta, grabitatez iragazi, -20 °C -tan izoztu eta liofilizadorearen bidez guztiz lehortu dira bukatzeko. 1 irudian, liofilizatutako kapsulen irudi makroskopikoa (A) eta $CaCl_2$ disoluzioan gogortze-prozesuan dauden kapsulen irudi mikroskopikoak (B) bildu dira. Azken irudiarekin sortutako kapsulen morfologia esferiko egokia eta buztan gabeko kapsulak lortu direla behatzen da.

1. Irudia. Kapsulen argazkiak: argazki makroskopikoa (A) eta mikroskopio optikoarekin ateratako argazkia (B)



3.2. Zahartzearen azterketa

Kapsulen zahartzea aztertzeko kapsula mota biak (alginato eta alginato-chitosan) hiru azpilaginetan banatu eta hiru baldintza desberdinetan gorde dira: giro tenperaturan eta argitan, giro tenperaturan eta ilunpean eta 50 °C-tan dagoen labe batean. Kapsulak 6 hilabetetan gorde dira baldintza horietan, eta 15-21 egunero kapsula mota eta gordeleku bakoitzetik 3 alikuota hartu dira hauen analisia egiteko.

3.3. Kapsulen analisia

Kapsulak analizatzeko, 0,1 g kapsula 1,5 mL sodio zitrato 0,2 M-eko disoluzio batekin nahasten da eta ultrasoinu bainuan uzten da ordu batez. Ondoren 8,5 mL metanol gehitzen da eta, nahastea iragazi eta diluitu ondoren, lagina prest dago likido kromatografia – diodozko detektagailuaren (LC-DAD) bidez neurtzeko.

Egindako analisien bidez THC, CBD eta CBN (kannabinol) kannabinoideen analisi kuantitatiboa eta THCA-ren (THC-aren forma azidoa) analisi erdikuantitatiboa egin ahal izan da.

3.4. Kapsulen hasierako konposizioa

Kapsulen zahartzea hasi aurretik kapsula mota bakoitzaren analisia egin da, enkapsulazio-prozesuaren etekina aztertzeko. Hasierako analisi honentzat THC-aren, CBD-aren eta CBN-aren kontzentrazioak determinatu dira.

1. Taula. Kannabinoideen kontzentrazioa kapsuletan mg/g-tan adierazita (n=3, 2s %95-eko konfiantza mailan)

Kapsula mota	THC	CBD	CBN
Alginato	6,2 ± 1,6	0,23 ± 0,05	< 0,1
Alginato-chitosan	4,7 ± 1,4	0,18 ± 0,03	< 0,1

Bi kapsula motetan antzeko kannabinoide kantitatea erauztea lortzen da jatorrizko erretxinatik. Chitosan gabeko kapsuletan hauen kontzentrazioa apur bat altuagoa bada ere, emaitzak estatistikoki bereizi ezinak dira ($p > 0,05$) hiru kannabinoideen kasuan.

Kontzentrazio hauen egokitasunari dagokionez, helburu terapeutikoetarako erabiltzen diren THC kapsuletan, THC-aren dosi maximoak 5 - 60 mg tartekoak dira (Whiting, 2015). Kapsula hauen 1 – 12 g bitartean kontsumituta dosi hauek lor daitezke, beraz, bideragarria izan daiteke.

CBD-ari dagokionez, kapsulen bidez hartzen denean, 200 - 800 mg –ko dosi maximoak erabiltzen dira gaixoentzat, beraz CBD-a hartzeko kapsula hauek ez lirateke izango aproposak (Whiting, 2015). CBD kontzentrazio aproposa kapsuletan izateko, CBD-an aberatsa den landare baten erretxinatik abiatu beharko ginateke.

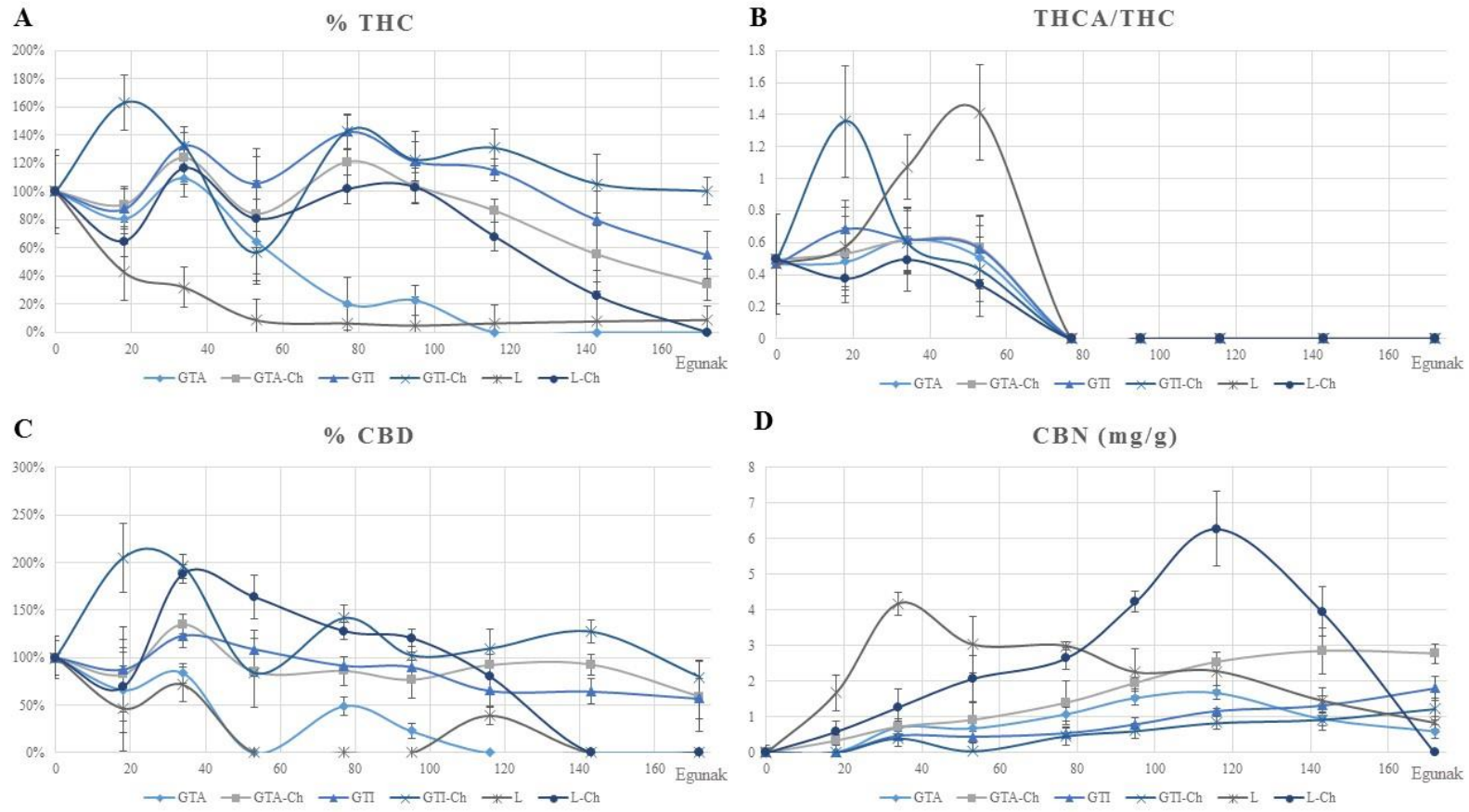
CBN-aren kasuan, haren edukia arbuiagarria kontsideratu daiteke eta gaur egun efektu sinergikoen estimulatzaile bezala erabiltzen da batez ere; beraz haren edukia aproposa izateko tarte zabala dauka.

3.5. Kapsulen zahartzea

Behin kapsulen hasierako konposizioa ezagututa, hiru kannabinoideen kontzentrazioen eboluzioa aztertu da (2. Irudia). Horretarako, hasierako kontzentrazioa % 100ean finkatu da, eta zahartze-puntu bakoitzeko kontzentrazioa honekiko konparatu da. CBN-aren kasuan, hasierako kontzentrazioa detekzio mugetatik behera zegoenez, ezin izan da ehunekorik kalkulatu eta zuzenean emaitzak mg/g-tan adierazi dira. THCA-ren kasuan, ezin izan da kontzentrazio zehatza determinatu, horren ordez, THCA-ren seinalea THC-aren seinalearekiko zatitu da eta honen aldaketa aztertu da.

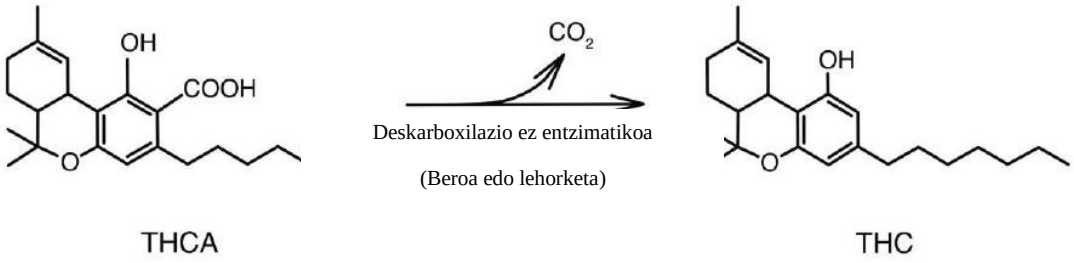
THC-aren eboluzioari dagokionez, gorabehera handiak ikusi dira bere zahartzean (2. Irudia A). Lehenengo 2-3 hilabeteetan kontzentrazioaren igoera orokor bat behatzen da, chitosan gabeko labeko laginetan izan ezik. Hasierako igoera hau THCA-ren degradazioa aztertuta azaldu daiteke (2. Irudia B). Kannabisak berez, kannabinoide guztien aitzindari azidoak ekoizten ditu bere hazkuntzan zehar, eta ondorioz, landarea mozten denean, kannabinoide azidoen kontzentrazioak bere forma ez azidoena baino askoz handiagoa izaten da. Kannabinoide azidoak, ordea, erraz degradatu daitezke deskarboxilazio erreakzio baten bidez (3. Irudia) bere forma ez azidoetara, batez ere beroaren laguntzaz. Kannabinoide azidoek orokorrean afinitate txikiagoa daukate SE-aren errezeptoreekin; THCA esaterako ez du efektu terapeutiko ez psikotropikorik sortzen. Arrazoi honengatik, kannabisa kontsumitzeko metodo gehienak berotze pausu bat daukate tartean (Taschwer eta Schmid, 2015).

2. Irudia. (A) THC, (B) THCA, (C) CBD eta (D) CBN kannabinoideen zahartzea 6 hilabetez, gordetze baldintza eta kaspula mota desberdinetarako, alginato kapsulak giro tenperaturan argitan (GTA), alginatochitosan kapsulak giro tenperaturan argitan (GTA-Ch), alginato kapsulak giro tenperaturan ilunpean (GTI), alginato-chitosan kapsulak giro tenperaturan ilunpean (GTI-Ch), alginato kapsulak 50 °C-tan dagoen labean (n=3, 2s %95-eko konfiantza mailan)



THCA-ren zahartze-prozesuaren emaitzei erreparatuta, THCA/THC erlazioa emaitzen ziurgabetasuna kontuan hartuz konstante mantentzen da lehenengo 2 hilabeteetan (giro tenperaturako eta ilunpetako alginato-chitosan kapsulen eta labeko alginato kapsulen laginetan izan ezik), baina 2 hilabete ondoren jaitsiera argi bat ematen da, THCA-ren seinalea detektaezina izan arte. Beherakada hau ikusita, THC-aren kantitatearen hasierako igoera azaldu daiteke, degradatzen den THCA THC bilakatzen delako. Giro tenperaturako eta ilunpetako alginato-chitosan kapsulen eta labeko alginato kapsulen laginetan ikusten diren gorabeherei ezin izan zaie azalpenik eman, kontrolpean ez dagoen beste faktore baten ondorioa izan daitezke.

3. Irudia. THCA-ren deskarboxilazio erreakzioa



THC-aren emaitzetara itzuliz, kontzentrazioaren gorakadaren ostean, jaitsiera orokorra ikusten da azken hilabeteetan. Esan bezala, THC-a erraz degradatzen da oxigenoarekin, argiarekin eta beroarekin; horregatik, argitan eta labean gordetako kapsulen THC-aren edukia asko gutxitu da, ilunpean eta

inguruko tenperaturan gordetako kapsulekin konparatuta. Chitosanaren eraginari dagokionez, argi ikusten da chitosana duten kapsuletan THC-aren degradazioa ez dela hain bortitza izan aztertutako edozein balditzetan, beraz alginato-chitosan kapsulek THC-a berotik eta argitik hobeto babesten dute alginatozko kapsulek baino.

CBD-aren zahartzea aztertzean (2. Irudia C) THC-aren zahartzaroaren oso pareko joera ikusten da. Hasierako kontzentrazioen igoera, kapsuletan egon daitekeen CBD azidoaren (CBDA) degradazioaren ondorioa izan daiteke, eta ostean ematen den kontzentrazioaren beherakada CBD-aren degradazioaren ondorioa da. THC-aren kasuan bezala, chitosana duten kapsulak babes gehigarria ematen diote CBD-ari argiaren eta beroaren aurrean, eta ilunpean eta giro tenperaturan ematen da CBD-aren kontserbazio optimoa.

Bukatzeko, CBN-aren zahartzeak oso joera desberdina pairatzen du (2. Irudia D). Kasu honetan kontzentrazioa etengabe igotzen da, labeko kapsula biak eta giro tenperatura argitan chitosan gabeko kapsuletan izan ezik, non beherakada bat ematen den puntu desberdinetan. Joera hau azaltzeko, THC-aren degradazioa hartu behar da kontuan. Izan ere, THC-aren degradazio-produktuetako bat CBN-a da (Carbone 2010). Horregatik, THC-a gehien degradatzen den baldintzetan (labean eta argitan) behatzen dira CBN kontzentrazio altuenak. Bukaerako beherakada, labeko laginetan bortitzagoa dena, CBN-aren degradazioaren edo lurrunketaren ondorioa izan daiteke.

4. Ondorioak

Lan honetan kannabis terapeutikoa aho-bidetik hartzeko bide alternatibo bat proposatu da, kannabinoideen enkapsulazioan oinarrituta. Hauen enkapsulazioa bi formulazio desberdin erabilita eraman da aurrera, alginatoa erabiliz eta alginato-chitosana erabiliz; eta bien arteko erkaketa egin da, formulazio optimoarekin bat egiteko.

Kapsulak eratzerakoan kannabinoideen kontzentrazioa aztertuta, dosifikatzeko egokitasuna ebaluatu da. Kapsula mota biak THC-an oinarritutako tratamendu baten dosifikazio egokia bermatzeko kontzentrazio egokia dutela ikusi da; CBD-an oinarritutako tratamendu baterako berriz, kapsulak egiteko erabiltzen den erretxina aldatu beharko litzateke. Edozein kasutan, kapsula biekin lortutako emaitzak estatistikoki konparagarriak dira.

Kapsulen zahartzea aztertzerakoan ordea, bi formulazioen arteko desberdintasuna nabarmendu da, chitosana gehitzearen garrantzia agerian utziz. Izan ere, chitosanak babes gehigarria eman die kannabinoide guztiei inguruneko faktore desberdinen aurrean, haien kontserbazioa hobetuz. Era honetan, chitosana duten kapsulak 6 hilabeteetan zehar ilunpean gordez gero, THCa % 100ean eta CBDa % 80an kontserbatzea baimentzen dute.

5. Etorkizunerako planteatzen den norabidea

Lortutako emaitzak ondorio orokorrak ateratzeko nahikoa izan dira, baina, azaldu ezin izan diren hainbat prozesu eman dira. Prozesu hauek kontrolpean egon ez diren zenbait faktoreen ondorioz eman daitezke, hala nola, gordelekuen hezetasuna, argiaren intentsitatea eta beste kannabinoideen presentzia. Izan ere, THCaz, CBDaz eta CBNaz gain beste hainbat kannabinoide daude, beste askoren artean, CBC, CBG, THCV eta CBDV eta guzti hauen forma azidoak esaterako. Haien artean kontzentrazioak baldintzatu ditzakete, batzuk besteen degradazio-produktuak direlako, beraz interesgarria izango litzateke zahartzea berriz aztertzea kannabinoide gehiago kontuan hartuz.

Horretaz gain, hauek irenstean digestio-prozesuan izango luketen aldaketak aztertzea interesgarria izango litzateke kapsulen egokitasuna ebaluatzen bukatzeko, ikuspuntu kimikotik behintzat. Horretarako, giza digestio-prozesuaren simulazioa burutu daiteke eta, horrela, kapsulek urdailean kannabinoideak egoki askatzen dituzten konproba daiteke.

6. Erreferentziak

Aizpurua-Olaizola, O.; Navarro, P.; Vallejo, A.; Olivares, M.; Etxebarria, N.; Usobiaga, A. (2016) Microencapsulation and Storage Stability of Pholyphenols from Vitis Vinifera Grape Wastes, *Food Chemistry*, 190, 614-621.

Aizpurua-Olaizola, O.; Elegarai, I.; Rico –Barrio, I.; Zarandona, I.; Etxebarria, N.; Usobiaga, A. (2017): Targeting the Endocannabinoid System: Future Therapeutic Strategies, *Drug Descovery Today*, 0, 1-6

Bonini, S. A.; Premoli, M.; Tambaro, S.; Kumar, A.; Maccarinelli, G.; Memo, M.; Mastinu, A. (2018): Cannabis sativa: A comprehensive ethnopharmacological review of a medicinal plant with a long history, *Journal of Ethnopharmacology*, 227, 300-315

Burgel, L.; Hartung, J.; Pflugfelder, A.; Graeff-Hönninger, S. (2020): Impact of Growth Stage and Biomass Fractions on Cannabinoid Content and Yield of Different Hemp (Cannabis sativa L.) Genotypes, *Agronomy*, 10, 372 - 389

Carbone, M.; Castelluccio, F.; Daniele, A.; Sutton, A.; Ligresti, A.; Di Marzo, V.; Gavagnin, M (2010): Chemical Characterisation of Oxidative Degradation Products of Δ_9-THC, *Tetrahedron*, 66, 9497-9501

ElSohly, M.A.; Radwan, M.M.; Gul, W.; Chandra, S.; Galal, A. (2017): Phytochemistry of Cannabis sativa L. In: Kinghorn, A.; Falk, H.; Gibbons, S.; Kobayashi, J.; *Phytocannabinoids. Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*, Springer, Switzerland, 103, 1-36

Esposito, E.; Drechsler, M.; Cortesi, R.; Nastruzzi, C. (2016): Encapsulation of Cannabinoid Drugs in Nanostructured Lipid Carriers, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 102, 87-91

Hazekamp, A.; Ware, M.A.; Muller-Vah, K. R.; Abrams, D.; Grotenhermen, F. (2013): The Medicinal Use of Cannabis and Cannabinoids—An International Cross-Sectional Survey on Administration Form, *Journal of Psychoactive Drugs*, 45, 199-210

Pérez de la Ossa, D. H.; Ligresti, A.; Gil-Alegre, M. E.; Aberturas, M. R.; Molpeceres, J.; Di Marzo, V; Torres Suárez, A. I. (2012): Poly-Ɛ-caprolactone Microspheres as a Drug Delivery System for Cannabinoid Administration: Development, Characterization and In Vitro Evaluation of their Antitumoral Efficacy, *Journal of Controlled Release*, 161, 927-932

Russell, C.; Rueda, S.; Room, R.; Tyndall, M.; Fischer, B. (2018): Routes of administration for cannabis use – basic prevalence and related health outcomes: A scoping review and synthesis, *International Journal of Drug Policy*, 52, 87-96

Śledziński, P.; Nowak-Terpiłowska, A.; Zeyland J. (2021): Cannabinoids in Medicine: Cancer, Immunity, and Microbial Diseases, *International Journal of Molecular Sciences*, 22, 263 – 284

Taschwer, M; Schmid, M.G. (2015): Determination of the relative percentage distribution of THCA and Δ9-THC in herbal cannabis seized in Austria – Impact of different storage temperatures on stability, *Forensic Science International*, 254,167-171

Wang, B.; Kovalchuk, A.; Li, D.; Ilnytskyy, Y.; Kovalchuk, I.; Kovalchuk, O. (2020): In Search of Preventative Strategies: Novel Anti-Inflammatory High-CBD Cannabis Sativa Extracts Modulate ACE2 Expression in COVID-19 Gateway Tissues, *Preprints*, 2020040315

Whiting, P.F. (2015): Cannabinoids for Medical Use A Systematic Review and Meta-analysis, *JAMA*, 313, 2456-2473.

7. Eskerrak eta Aipamenak

Lan hau Fundacion Renovatiok emandako erretxinari esker eraman ahal izan da aurrera. Bestalde, A. Villate ikerlariak eskerrak eman nahi dizkio Euskal Herriko Unibertsitateari bere doktoretza aurreko languntzagatik.

Laser ultralabur baten bidezko urrezko estaldura meheen ablazioa

Armendariz, L.[1,2]; Rodr´ıguez, A.[1,3]; Pan, A.[1,3];
Beldarrain, O.[1,3] eta López, G.A.[2]

[1] CEIT - Basque Research and Technology Alliance (BRTA), Manuel Lardiazabal 15, 20018 Donostia/San Sebastian.
[2] Fisika Saila, Zientzia eta Teknologia Fakultatea, UPV/EHU, Sarriena Auzoa s/n, 48940 Leioa, Bizkaia.
[3] Tecnun, Universidad de Navarra, Manuel Lardiazabal 13, 20018 Donostia/San Sebastian.

larmendarizm@ceit.es

Laburpena

Fluentzia-ataria garrantzi handiko parametroa da laser bidezko ablazio prozesuetan. Izan ere, honen determinazioa ezinbestekoa da egitura nanometrikoen fabrikazioa optimizatzeko. Lan honetan, laser ultralabur baten bidez pultsu kopuru desberdinak irradiatuz 300 nm-ko lodiera duen urrezko geruza mehe baten fluentzia-ataria aztertu da. Era berean, materialaren ezaugarri den inkubazio-faktorea lortu da, laserraren erradioaren estimazioa egitearekin batera. Bestalde, geruzaren dimentsioak fluentzia-atarian duen eragina aztertu da, fluentzia-atariak lodierarekiko duen joera behatuz. Azkenik, kromoz eta urrez osaturiko geruza bikoitza ikertu eta aldez aurretik urrezko geruzaren kasuan lortutako emaitzekin erkatu da.

Hitz gakoak: Laser ultralaburra, Fluentzia-ataria, Urrea, Estaldura mehea.

Abstract

Fluence threshold is an important parameter in laser ablation processes. In fact, its determination is essential to optimize the fabrication of submicrometric structures in materials. In this work, the fluence threshold of a 300-nm gold thin film was studied by applying different number of pulses through ultrafast laser irradiation. In addition, the incubation factor characteristic of the material was obtained and an estimation of the spot radius was made. Moreover, the effect of layer thickness on the fluence threshold has been analized. Finally, double layers composed by chromium and gold layers were studied and compared with the previously obtained results for the gold film.

Keywords: *Ultrafast laser, Fluence threshold, Gold, Thin film.*

1. Sarrera eta motibazioa

Laserren erabilerak, garapenak eta ikerkuntzak hazkuntza esponentziala jasan du azken hamarkadetan. Izan ere, 1980 urtetik aurrera, gero eta ikerketa eta aurrerapen gehiago burutu dira laserren esparruan. Halaber, teknologia berrien aurrerapenarekin batera, metalezko estaldura meheen erabilera handitu da industria, medikuntza eta biologia bezalako sektoreetan (Zhou *et al.*, (2020)).

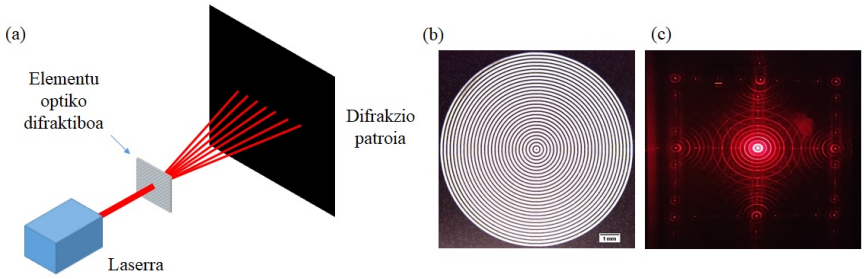
Geruza meheetan ablazio-prozesuak burutzerako orduan laserren teknologia erabiltzen da. Laser ultralaburrak femtosegunduko (10^{-15} s) ordeneko iraupena duten pultsuak igortzen dituzten laserrak dira. Azken urteotan egindako ikerketetan ikusitako abantailen ondorioz, hauen erabilera suspertu da (Chichkov *et al.*, (1996); Furusawa *et al.*, (1999)). Bero hedapenaren gutxitzearekin batera, energiaren deposizio-denbora laburrari esker, kaltetutako eremuaren bolumena txikiagotzen da, prozesu garbiagoak lortuz (Jia eta Zhao, (2019)). Modu honetan, bereizmen nanometrikoa bermatzen da, laser izpiaren uhin-luzeraren azpiko zehaztasuna lortzen delarik. Hortaz, laser ultralaburrek, aipatutako aurrerapenak direla bide, prozesuen kalitatea optimizatzea lortu dute.

Ablazioa, laserraren irradiazioaren bidez ematen den solido baten gainazaleko materialaren eransketa prozesuari deritzo. Laser batekin metalaren gainazala irradiatzean, erradiazioaren energia xurgatzearen ondorioz elektroi askeak kitzikatzen dira tenperatura altuak lortuz. Elektroi-azpisistemaren erlaxazioa, ioi sareari transmitituriko energiaren bitartez gertatzen da, energia-trukea elektroien eta fonoien arteko akoplamenduaren bitartekoa izanik. Azkenik, energiaren birbanaketa berri bat ezartzen da, non atomoen loturak apurtzen diren materialaren hedapena

eraginez. Talka-uhinaren ondorioz, gainazaletik materiala eranzten da krater bat sortuz (Rethfeld *et al.*, (2017)).

Geruza meheen ablazioaren aplikazioetako bat, difrakzio elementu optikoen (*Diffractive optical elements*) ekoizpena da. Gailu hauek laser izpia birmoldatzeko erabiltzen dira. Izan ere, metalezko geruzan ekoiztutako patroiek argia partzialki igarotzea ahalbidetzen dute (ikus 1 irudia) eta difrakzio fenomenoaren ondorioz intentsitatearen distribuzio berri bat lortzen da. Estaldura meheen ablazioaren bidez, elementu optiko hauen ekoizpena modu erraz, merke eta azkar batean egitea ahalbidetzen da, orain arte erabilitako prozesu-kimiko konplexuagoak ordezkatzeko aukera hobea izanik.

1. irudia: **(a) Difrakzio elementu optikoaren erabileraren eskema. (b) Ablazio bidez ekoizturiko elementu optikoaren irudia. (c) Hau erabilitakoan lortzen den izpiaren distribuzioa.**



Ablazio-prozesuak burutzerako orduan, fluentzia-ataria deritzon energia jakin bat behar da ablazioari hasiera emateko. Parametro hau metalaren propietate optikoen eta termodinamikoen araberakoa da, hortaz, honen azterketa funtsezko erronka da ablazio-prozesuak kontrolatzeko eta hobetzeko orduan (Zhou *et al.*, (2020)).

2. Arloko egoera eta ikerketaren helburuak

Azken urteotan hainbat ikerketa burutu dira urrezko pelikula meheen inguruan, era berean maiz kalkulatu dira fluentzia-ataria eta inkubazio-faktorea (Ni *et al.*, (2006); Güdde *et al.*, (1998)). Beste argitalpen batzuetan ere estalduraren lodierak fluentzia-atarian duen eragina aztertu da (Krüger *et al.*, (2007); Kern *et al.*, (2011)), dena dela ez da teoriarik bilatu portaera hori azaltzeko, ez baitute joera argi bat antzeman. Bestalde, geruza anitzeko egiturek propietate mekaniko, termiko eta elektriko hobeak erakusten dituztenez (Qiu *et al.*, (1994)), hauen ikerketak garrantzi handia hartu du aplikazioetan ekar dezakeen hobekuntzak direla eta.

Era berean, ikuspuntu teoriko batetik ablazio-prozesua beste hainbatetan aztertu da. Bi tenperaturen eredu klasikoak (TTM) fenomeno hau deskribatzen du, non elektroien eta ioien artean desoreka termodinamikoa onartzen den. Bi ekuazioz osatutako eredua, elementu finituen metodoan oinarritzen den simulazio bidez aztertu da hainbatetan (Kim *et al.*, (2020)).

Lan honetan pultsuen esperimentuaren bidez 300 nm-ko lodiera duen urre geruza baten fluentzia-ataria eta inkubazio-faktorea kalkulatu dira. Bestalde, lodiera desberdinak (50 nm - 420 nm) eta geruza bikoitzak dituzten laginetarako analisi bera errepikatu da behatzen diren efektuak aztertzeko asmoz. Hauek dira lortu nahi diren helburu nagusiak:

- Urrearen ablazio-prozesurako parametro-tartea aurkitzea eta optimizatzea, mikroegitura garbiak lortzeko.
- Geruzaren lodierak fluentzia-atarian izan ditzakeen efektuak aztertzea eta joera bat bilatzea.
- Substratuaren eta estalduraren artean kromo-geruza bat gehitzeak duen eragina aurreko emaitzekin erkatzea.

3. Ikerketaren muina

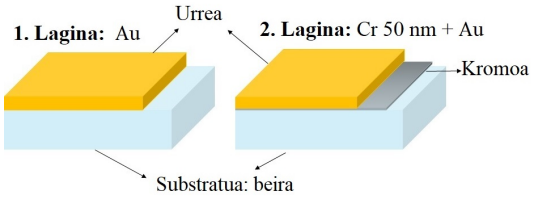
3.1. Konfigurazio esperimentala

Ikerketan erabilitako laginak urrearen eta beiraren arteko konbinazioak izan dira (ikus 2. irudia). Substratu bezala 1 mm-ko lodiera duen borosilikatozko beira erabili da, non ihinztadura katodiko (*magnetron sputtering*) bitartez urrezko pelikula meheak metatu diren. Hauen dimentsioak prozesuaren denboraren bitartez kontrolatu dira 50-420 nm bitarteko lodiera duten sei lagin lortuz. Bestalde, estaldura anitzeko beste bi lagin sortu dira: beirazko

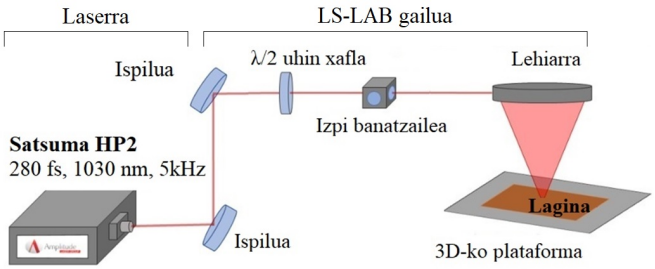
substratuan 50 nm-ko kromozko geruza bat eta honen gainean 250 nm-ko eta 350 nm-ko lodiera duten urrezko pelikulak. Era honetan, guztira 300 nm-ko eta 400 nm-ko pelikula anitzak ekoiztu dira. Lodieren karakterizazioa perfilometro mekaniko baten bitartez burutu da.

Iterbio zuntz laserra (Satsuma Amplitude HP[2]) erabili da 280 fs-ko iraupena duten linealki polarizatutako pultsuak sortzeko. Uhin xafla batez, izpi banatzaile batez eta lehiar batez osatutako LASEA markako LS-LAB ereduko sistema optikoak, laser izpiaren parametroak eraldatu eta laser-prozesuak bideratzen ditu (ikus 3. irudia). Konfigurazio optiko guztia KYLA izeneko programa baten bitartez kontrolatu da, zeinak laser izpiaren parametroak finkatzea eta egiturak diseinatzea ahalbidetzen duen. 1030 nm-ko uhin-luzera zentrala duen erradiazioa igorri da 5 KHz-ko maiztasuna finkatuz. Era honetan, 20 μJ-ko pultsuko energia eta 5 $\mathrm{J/cm^2}$-ko fluentzia maximoa lortu dira. Laser izpiak $M^2 = 1.10$-ko kalitate faktorea eta $\varnothing_0 = 30$ μm-ko diametroa ditu. Praktika esperimental guztiak baldintza normaletan eta giro tenperaturan burutu dira.

2. irudia: **Fabrikaturiko laginen egitura.**



3. irudia: **Konfigurazio optikoaren diagrama.**



Laginen karakterizazioa JEOL FEG-SEM (*Scanning Electron Microscope*) ekortze mikroskopio elektronikoaren bidez eta Oxford Instruments EDX (*Energy Dispersive X-ray spectroscopy*) analisiaren bitartez egin da. Sortutako kraterren diametroak Gwyddion izeneko irudien analisiko programarekin neurtu dira.

3.2. Pultsu bakar eta anitzeko saiakerak

Liu autoreak, 1982an, fluentzia-ataria kalkulatzeko metodo bat argiratu zuen lehen aldiz bere lanean. Laser izpiaren fluentziak honako distribuzio Gaussiarra jarraitzen du,

$$F(r) = F_0 e^{-2r^2/w_0^2} \qquad F_0 = \frac{2E_p}{\pi w_0^2} \tag{1}$$

non w_0 izpiaren erradioa, r koordenatu erradiala eta E_p izpiak pultsuko duen energia diren. Laserrari finkatzen zaion F_0 distribuzio Gaussiarraren fluentzia maximoa da. Alde batetik, pultsuko energia aldatuz joan da 0.1 μJ eta 20 μJ bitartean $0 - 5$ $\mathrm{J/cm^2}$-ko fluentziak lortuz. Bestalde, irradiazio-denbora finkatzen duen *burst time* izeneko parametro baten bidez pultsu kopurua kontrolatu da. Maiztasuna 5 KHz-tan ezarriz, $t_b = N/f$ ekuazioaren arabera, 200 μs eta 22000 μs tarteko denborekin, 1 eta 100 bitarteko pultsu kopuruak lortu dira. D diametroko krater baten ablazioa eragiteko fluentzia minimoa fluentzia-ataria (F_{th}) izanik, ondorengo ekuazioa betetzen da,

$$D^2 = 2w_0 ln\Big(\frac{F_0}{F_{th}}\Big) \tag{2}$$

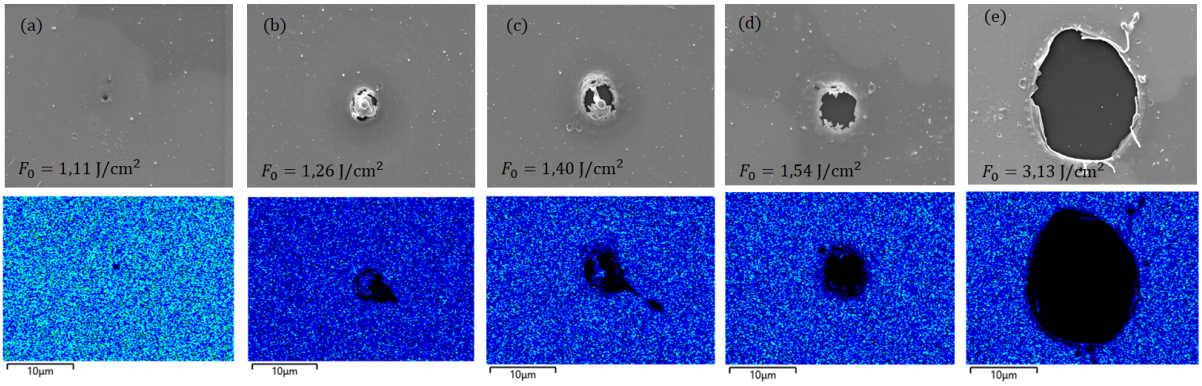
$D^2 - lnF_0$ grafika semilogaritmikoa irudikatuz gero eta $D^2 = 0$ estrapolazioa eginez, fluentzia-ataria lortu da kasu bakoitzerako. Era berean, izpiaren erradioa kalkulatu da zuzenaren maldatik. Kraterrak guztiz zirkularrak ez direnez, bi norabideetan egin da analisia, ondoren batezbesteko bat kalkulatuz.

$$D_i^2 = 2w_{0_i} lnF_0 - 2w_{0_i} F_{th_i} \qquad i = x, y \tag{3}$$

Fluentzia-ataria kalkulatzeko prozedura honi, diametro karratuaren metodoa deritzo. Azaldutako prozedura jarraituz, 300 nm-ko estaldura duen urrezko lagin baten ablazio-prozesua aztertu da.

Prozesuaren bilakaera 4. irudian ikusten da, non pultsu bakarrarekin hainbat fluentziatara egindako zuloak adierazten diren. 4. irudiko goiko irudietan, ekortze-bidezko mikroskopio elektronikoaz egindako argazkiak azaltzen dira. Behekoetan aldiz, EDX bidezko laginaren konposizio kimikoaren irudiak daude, non kolore urdina urreari dagokion eta beltza aldiz beirari.

4. irudia: **SEM eta EDX bidez lortutako pultsu bakarreko ablazio-prozesuen irudiak fluentzia ezberdinetara 300 nm-ko urrezko estalduraren kasuan.**



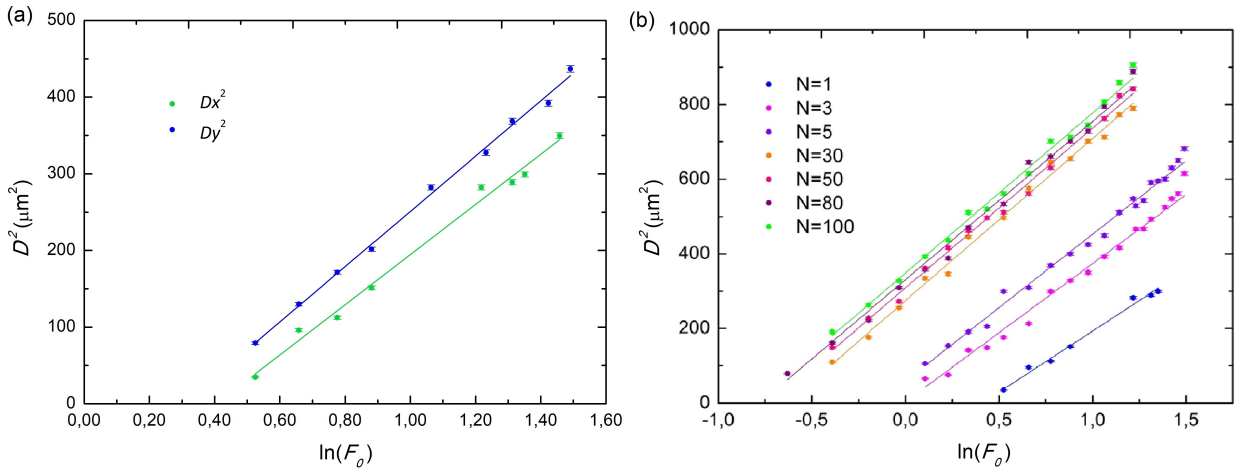
4.a. irudian urrezko gainazalak erradiazioa xurgatu duen arren, ez da aldaketarik nabarmentzen. Izan ere, ez da ablazio-prozesuari hasiera emateko adina energia ezarri. Fluentzia igo ahala, 4.b. eta c irudietan estalduraren baztertze ahul bat antzeman daiteke, hala ere, oraindik ez dago zulo garbirik. $F_0 = 1.54$ J/cm^2 ko baliora iristean (ikus 4.d. irudia), lehenengo aldiz estaldura guztiz kendu da azpiko substratua agerian utziz. Hortaz, fluentzia-atariaren balioa 1.11 J/cm^2 eta 1.54 J/cm^2 bitartekoa izango dela ondorioztatu da. Azkenik, 4. irudia bere osotasunean aztertuz, fluentziaren igoerarekin batera, sortutako kraterren diametroak handitzen direla ikusten da.

Irudi hauek aztertuz eta diametro guztiak neurtuz, 5.a. irudiko emaitzak lortu dira pultsu bakarraren kasurako. Fluentzia-atarientzako $F_{th_1}(1) = (1.50 \pm 0.04)$ J/cm^2 eta $F_{th_2}(1) = (1.35 \pm 0.02)$ J/cm^2 balioak lortu dira. Hortaz, bien arteko batezbestekoa kalkulatuz $F_{th}(1) = (1.43 \pm 0.04)$ J/cm^2 balioa lortu da. Lortutako emaitza bat dator 4. irudian aurreikusitakoarekin.

Laser izpiaren erradioari dagokionez, erregresioaren maldatik, $w_{0_x} = (12.8 \pm 0.2)$ μm eta $w_{0_y} = (13.4 \pm 0.1)$ μm balioak kalkulatu dira eta era berean, $w_0 = (13.1 \pm 0.2)$ μm-ko batezbesteko erradioa lortu da.

Prozesu berdina errepikatuz, 5.b. irudiko datuak erabiliz pultsu kopuru bakoitzeko fluentzia-ataria eta izpiaren erradioa kalkulatu dira. Ikus daiteke, zuzenen maldak antzekoak direla kasu guztietan, erradioa berdina baita. Bestalde, fluentzia-ataria, zuzenak ordenatu ardatzarekin duen ebakidura puntuak determinatzen duena, pultsu kopurua handitu ahala gero eta txikiagoa da.

5. irudia: **Neurtutako diametroen datuak eta hauen erregresio linealak (a) Pultsu baterako (b) Pultsu anitzetarako.**



3.3. Inkubazio-faktorea

Inkubazio-ereduaren arabera (Jee *et al.*, (1988)), fluentzia-ataria pultsu kopuruaren araberakoa da. $F_{th}(N)$, N pultsuren fluentzia-ataria izanik, ondorengo erlazioa betetzen da,

$$F_{th}(N) = F_{th}(1)N^{\xi-1} \tag{4}$$

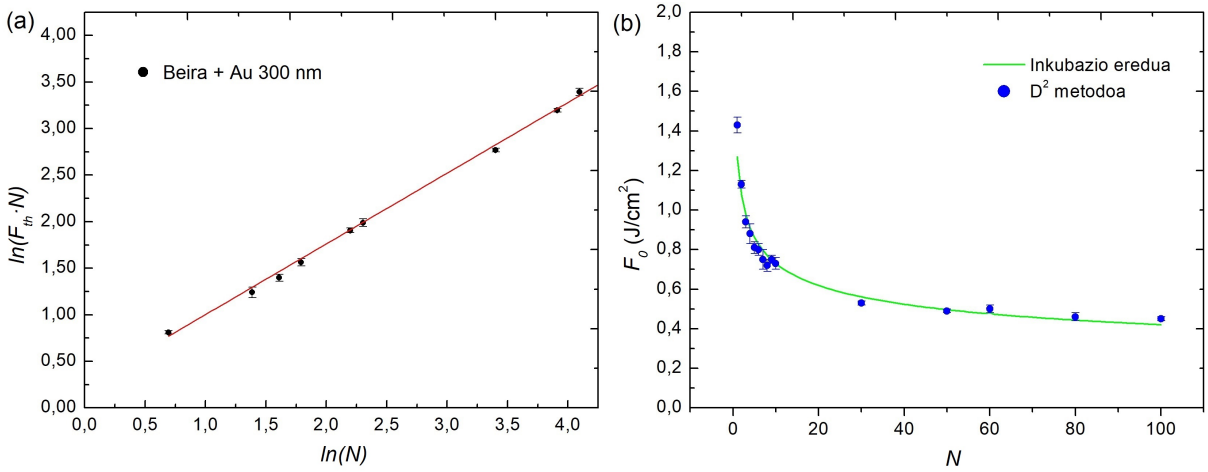
Ekuazio honetan agertzen den ξ-ri inkubazio-faktorea deritzo. Faktore honek, materialari eragindako kalte-metaketa adierazten du. Metalen kasurako, $\xi = 0.7 - 0.9$ bitarteko inkubazio-faktoreak lortu dira (Kern *et al.*, (2011)). Pultsu kopuruarekin batera, materialaren deformazioak eransketari laguntzen dio.

Inkubazio-faktorea eta pultsu bakarreko fluentzia-ataria kalkulatzeko, 4 ekuazioa ondoko eran adierazten da.

$$ln(F_{th}(N) \cdot N) = lnF_{th}(1) + \xi lnN \tag{5}$$

6.a. irudian, lortutako emaitzak adierazi dira 5 ekuazioa jarraituz. Maldatik, $\xi = 0.76 \pm 0.01$ balioa determinatu da urrearen inkubazio-faktorearentzat. Balio hau aurrez egindako esperimentuekin bat dator, izan ere, Ni *et al.* autoreek 2006. urtean egindako ikerketan 0.765 balioko inkubazio-faktorea lortu zuten.

6. irudia: **(a) Pultsu kopuru bakoitzeko lortutako fluentzia-atariak eta hauen erregresio lineala. (b) Lortutako emaitzen konparazioa inkubazio-ereduarekiko.**



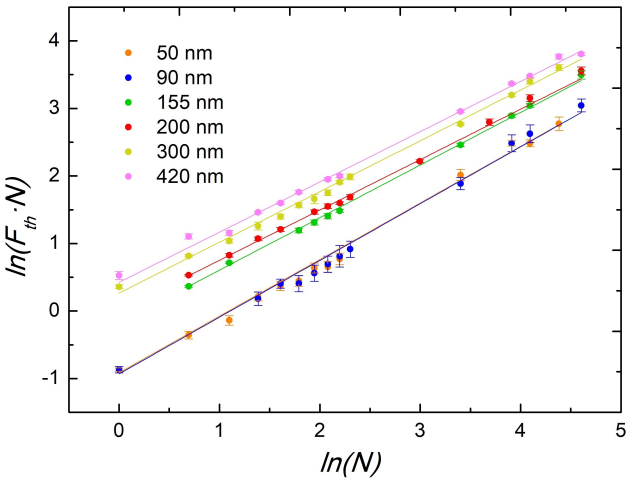
Bestalde, 6.a. irudian oinarrituz pultsu bakarrerako fluentzia-ataria kalkula daiteke, non kasu honetan $F_{th}(1) = (1.27 \pm 0.04)$ J/cm^2-ko balioa den. Arestian 3.2 atalean lortutako emaitzarekin erkatuz, balio txikiagoa lortu da kasu honetan. Hala ere, 4. irudiari erreparatuz, azken balio hau aurreikusitako tartean kokatzen da.

6.b. irudian, alde batetik 4 ekuazioa jarraitzen duen kurba irudikatu da $F_{th}(1) = 1.27$ J/cm^2 eta $\xi = 0.76$ emaitzetan oinarrituz. Bestalde, diametro karratuaren metodoa erabiliz 3 ekuazioarekin lortutako emaitzak adierazi dira. Halaber, baliozkotasuna aztertzeko helburuz, bi metodoen arteko errore erlatiboa kalkulatu da. Pultsu bakarreko kasuan, inkubazio-faktorearen teoria $\%$ 12an urruntzen da D^2 metodoaren bitartez kalkulatutako baliotik. Pultsu bakarra aplikatzean, sortutako kraterrak irregulartasun handiagoa erakusten dute, hortaz kontuan hartu ez ditugun neurketa erroreak egon daitezke desbideraketa honen atzean. Hala ere, pultsu kopurua igo ahala, errorea jaisten da $\%$ $0 - \%$ 7 balioen artean mantenduz, zeina onargarritzat har daitekeen. Beraz, esan dezakegu bi metodoak baliagarriak direla fluentzia-atariak kalkulatzeko.

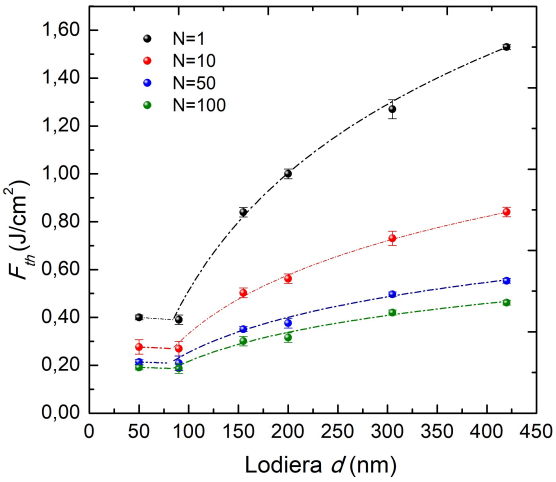
3.4. Estalduraren lodieraren eragina

Atal honetan, 50-420 nm bitarteko lodierak dituzten sei lagin aztertu dira aurreko ataleko prozedura berdina jarraituz. Era berean, 7. irudiko emaitzak lortu dira 3.3 ataleko inkubazio-eredua jarraituz. Ikus dezakegun bezala, zuzenen malda antzerakoa da kasu guztietarako, ondorioz esan dezakegu inkubazio-faktorea ez dela estalduraren lodieraren araberakoa. Batez besteko balioa kalkulatuz $\xi = 0.78 \pm 0.02$ balioa lortu da.

7. irudia: **50 eta 420 nm bitarteko lodiera duten laginen datuak eta erregresio linealak.**



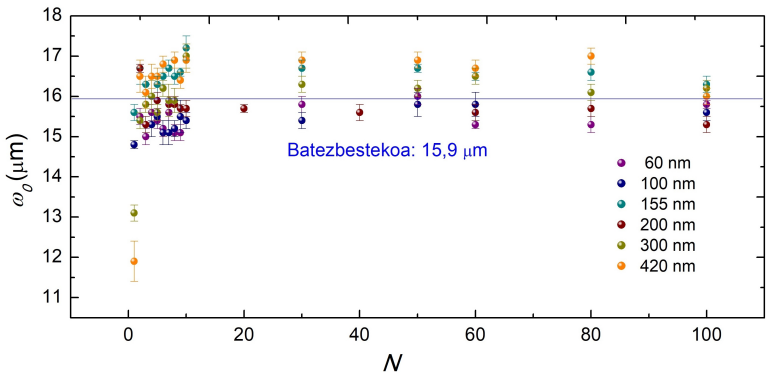
8. irudia: **Geruzaren lodieraren arabera kalkulaturiko fluentzia-atariak 1, 10, 50 eta 100 pultsurentzat.**



Bestalde, geruza lodiagoek fluentzia-atari handiagoa dute meheek baino. 8. irudian lodieraren araberako emaitzak adierazi dira 1, 10, 50 eta 100 pultsu kopuruentzat. Kasu guztietan, 100 nm ingurutik beherako estalduretan, fluentzia-ataria konstante mantentzen da. 100 nm baino handiagoak diren pelikuletan aldiz, fluentzia-ataria lodierarekin batera igotzen da. Igoera motelagoa da gero eta pultsu gehiago aplikatuz, fluentzia-ataria tarte txikiago batean kontzentratzen baita. Azken fenomeno hau aurrez aldetik aipatutako inkubazio-teoriaren ondorioa da.

Azkenik, pultsu kopuru eta lodiera desberdinekin lortutako laser izpiaren erradioaren balioak 9. irudian adierazten dira. Batezbestekoa kalkulatuz, $w_0 = (15.9 \pm 0.2)\ \mu\mathrm{m}$ balioa lortu da. Balio hau pultsu bakarreko kasuan kalkulatutakoa ($w_0 = (13.1 \pm 0.2)\ \mu\mathrm{m}$) baino hobea da. Izan ere, aurreko atalean ondorioztatu den bezala, pultsu bakarreko kasuan emaitzen zehaztasuna ez da hain ona, errore erlatiboa handiagoa da eta.

9. irudia: **Izpiaren erradioarentzat lortutako emaitza guztiak eta hauen batezbestekoa.**



3.5. Geruza anitza: kromoa eta urrea

Ikerketaren azken zatian, urrea eta beiraren artean kromo-geruza bat gehitzeak ablazioan duen eragina aztertu da. Honetarako, bi lagin aztertu dira: beira substratu gisa, 50 nm kromo eta 250 nm eta 350 nm-ko lodiera duen urrezko geruza konposatua, non 300 eta 400 nm-ko lodiera osoak lortu diren, hurrenez hurren.

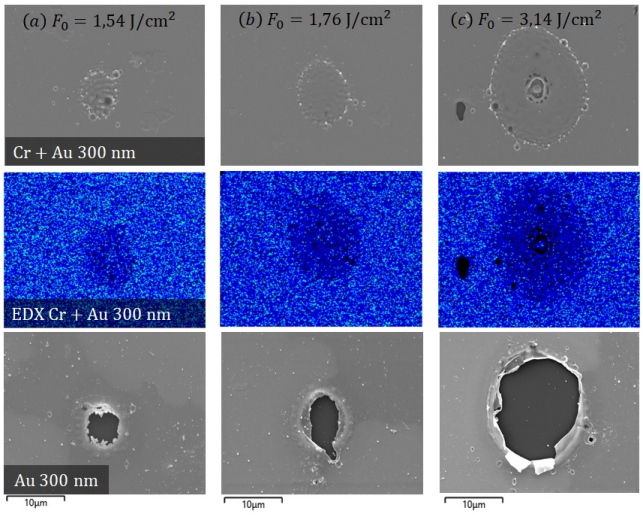
Bi lagin hauen kasurako aurreko ataletan jarraitutako metodologia berdina errepikatu da. 300 nm-ko estaldura duen laginaren ablazio-prozesua 10. irudian erakusten da. Goiko lerroko irudietan mikroskopio elektroniko bidez egindako irudiak agertzen dira geruza bikoitzaren kasurako. Erdiko lerroan, lagin berdinaren konposizioaren analisi-mapa agertzen da. Beheko irudietan aldiz, soilik urrea duen laginaren irudiak daude fluentzia berdinetan.

Urrezko laginak ablazio-prozesuari hasiera ematen dionean, $F_0 = 1.54\ \mathrm{J/cm^2}$ izanik (ikus 10.a. irudia), ez da ablaziorik antzematen geruza bikoitzaren kasuan. Hala ere, urrearen urtzeari dagokion metalaren gainazaleko aldaketa bat nabarmentzen da. Finkatutako potentzia igo ahala, urtutako eremua handituz doa $F_0 = 3.14\ \mathrm{J/cm^2}$ baliora heldu arte, non 10.c. irudian, lehenengo aldiz ablazio-fenomenoa antzematen den. Dena den, ablazioa jasan duen eremua oso txikia da beste laginaren eremuarekin erkatuz gero. Irudia osotasunean aztertuz, kromo geruza bat ezartzean metalaren fluentzia-ataria igotzen dela ondorioztatu da.

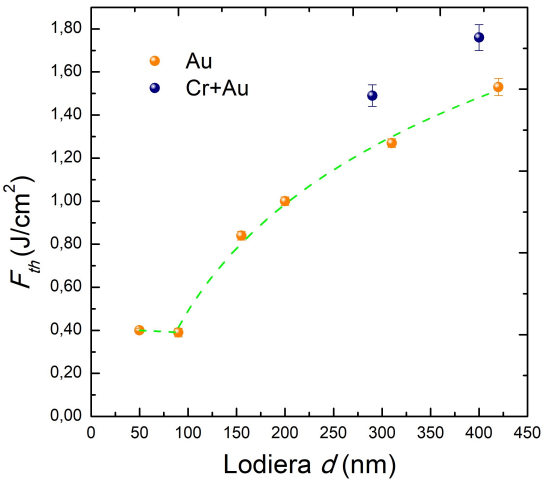
Kasu honetan, 0.77 ± 0.01 eta 0.73 ± 0.01-ko inkubazio-faktoreak eta $(1.49 \pm 0.05)\ \mathrm{J/cm^2}$ eta $(1.76 \pm 0.06)\ \mathrm{J/cm^2}$-ko fluentzia-atariak lortu dira 300 eta 400 nm-ko geruza anitzeko laginen kasuan, hurrenez hurren. Emaitza hauek 11. irudian adierazi dira aurretik urrezko laginaren kasurako lortutako emaitzekin batera.

11. irudia aztertuz, alde batetik, pelikularen lodierarekin batera fluentzia-atariaren igoera antzematen da 100 nm baino gehiagoko estaldurentzat. 100 nm baino gutxiagoko estalduretan, ataria konstante mantentzen da. Izan ere, hainbat lanetan frogatu den bezala (Hohlfeld *et al.*, (1997)), elektroiak oztopo gabe higitzen dira ingurunearen luzera elektroien luzera balistikoa baino txikiagoa den kasuetan. Literaturan frogatu da luzera hori 100 nm ingurukoa dela. Izan ere, lodiera txikiagotan modu homogeneoan sakabanatzen dira elektroiak, energia homogeneoki banatuz ingurune osoan zehar. Distantzia handietan aldiz, gero eta gehiago kostatzen zaie elektroiei ingurunea berotzea, hortaz erradiazio gehiago behar izango da ablazio-prozesuari hasiera emateko.

10. irudia: **SEM eta EDX bidez lortutako pultsu bakarreko ablazio-prozesuen irudiak bi laginentzat.**



11. irudia: **Geruzaren lodieraren arabera kalkulaturiko fluentzia-atariak pultsu bakarra aplikatuz bi laginen kasurako.**



Bestetik, 11. irudiko geruza bikoitzaren kasuan, fuentzia-atariaren igoera behatu da aztertutako bi lodiera ezberdinetarako. Igoera hau akoplamendu konstanteari dagokio, kromoak urreak baino akoplamendu konstante bortitzagoa baitu ($G(\mathrm{Au}) = 2.65 \cdot 10^{16}\ \mathrm{Wm^{-3}K^{-1}}$ eta $G(\mathrm{Cr}) = 4.2 \cdot 10^{17}\ \mathrm{Wm^{-3}K^{-1}}$) (Qiu *et al.*, (1994)). Hortaz, berotutako elektroiak bi materialen arteko mugara heltzean, kromoak lehenago pasako du energia bere sarera, energia gehiago xahutuz. Ondorioz, urrearen sarera energia gutxiago helduko da, gehiago kostatuko zaio ablazio-prozesurako behar duen energia lortzea, eta era berean, ataria igoko da.

4. Ondorioak

Lan honetan urrezko geruza meheen fluentzia-ataria aztertu eta kalkulatu da. Honekin batera materialaren inkubazio-faktorea eta laser izpiaren erradioa zehaztu dira. Era berean, elektroien mugimenduarekin lotu den geruzaren lodierarekiko portaeran joera argi bat behatu da. Geruza meheentzat, fluentzia-ataria konstante mantendu da. Estaldura lodiagotan aldiz, hazkuntza joera erakutsi da, 100 nm-ak bi tarteen arteko muga izanik. Azkenik, kromo geruza bat gehitzearen eragina ikertu da fluentzia-atari altuagoak lortuz aztertu diren kasuetarako. Emaitza hau onuragarria izan daiteke hainbat aplikaziorako, irradiazioarekiko erresistentzia handiagoa erakusten duten materialak ekoizteko besteak beste. Ildo beretik, geruza anitzek propietate hobeak eskaini dezaketela aurreikusi da. Lan

honetan, edozein materialetan aplikaturiko ablazio-prozesuak optimizatzeko metodologia bat diseinatu eta frogatu da. Beraz, ikerketa berdina aplikatu daiteke interesatzen den materiala prozesatzeko parametroak finkatzeko.

5. Etorkizunerako planteatzen den norabidea

Behin pultsu estatikoen fluentzia-atariak kalkulatuta, difrakzio elementu optikoen ekoizpenerako patroiak sortzeko oinarria finkatu da. Emaitza hauek abiapuntutzat hartuz, modu dinamikoan egindako prozesuen parametroak finkatu daitezke. Izan ere, laserraren ekortze-abiadura puntu batean jausten den pultsu kopuruarekin erlazionatuz, prozesuan kontuan hartu beharreko fluentzia-ataria estimatu daiteke. Laserraren modu dinamikoaren bitartez, hainbat patroi egituratu daitezke, lerro sinple batetik hasiz, nahi adina egitura konplexu diseinatzeraino. Hortaz, lerroetan eta gainazaletan zehar ablazioa lortzeko prozesua optimizatzea da hurrengo urratsa. Behin hori lortuta, difrakzio elementu optikoetan nahi den diseinua egituratzeko erabil behar diren parametroak finkatuta egongo direlarik.

6. Erreferentziak

Chichkov, B.N., C. Momma, S. Nolte, F. von Alvensleben, eta A. Tünnermann. (1996). Femtosecond, picosecond and nanosecond laser ablation of solids. *Applied Physics A: Materials Science & Processing* 63.109–115.

Furusawa, K., K. Takahashi, H. Kumagai, K. Midorikawa, eta M. Obara. (1999). Ablation characteristics of au, ag, and cu metals using a femtosecond ti:sapphire laser. *Applied Physics A: Materials Science and Processing* 69.S359–S366.

Güdde, J., J. Hohlfeld, J.G. Müller, eta E. Matthias. (1998). Damage threshold dependence on electron–phonon coupling in au and ni films. *Applied Surface Science* 127-129.40–45.

Hohlfeld, J., J. Müller, S.-S. Wellershoff, eta E. Matthias. (1997). Time-resolved thermoreflectivity of thin gold films and its dependence on film thickness. *Applied Physics B-lasers and Optics* 64.387–390.

Jee, Y., M.F. Becker, eta R.M. Walser. (1988). Laser-induced damage on single-crystal metal surfaces. *J. Opt. Soc. Am. B* 5.648–659.

Jia, X., eta X. Zhao. (2019). Numerical study of material decomposition in ultrafast laser interaction with metals. *Applied Surface Science* 463.781–790.

Kern, C., M. Zuerch, J. Petschulat, T. Pertsch, B. Kley, T. Käsebier, U. Hübner, eta C. Spielmann. (2011). Comparison of femtosecond laser-induced damage on unstructured vs. nano-structured au-targets. *Applied Physics A* 104.15–21.

Kim, B., H.K. Nam, S. Watanabe, S. Park, Y. Kim, Y.-J. Kim, K.i Fushinobu, eta S.-W. Kim. (2020). Selective laser ablation of metal thin films using ultrashort pulses. *International Journal of Precision Engineering and Manufacturing-Green Technology* .

Krüger, J., D. Dufft, R. Koter, eta A. Hertwig. (2007). Femtosecond laser-induced damage of gold films. *Applied Surface Science* 253.7815–7819.

Liu, J.M. (1982). Simple technique for measurements of pulsed gaussian-beam spot sizes. *Opt. Lett.* 7.196–198.

Ni, X., C. Wang, L. Yang, J. Li, L. Chai, W. Jia, R. Zhang, eta Z. Zhang. (2006). Parametric study on femtosecond laser pulse ablation of au films. *Applied Surface Science* 253.1616–1619.

Qiu, T.Q., T. Juhasz, C. Suarez, W.E. Bron, eta C.L. Tien. (1994). Femtosecond laser heating of multi-layer metals-ii. experiments. *International Journal of Heat and Mass Transfer* 37.2799–2808.

Rethfeld, B., D.S. Ivanov, M.E. Garcia, eta S.I. Anisimov. (2017). Modelling ultrafast laser ablation. *Journal of Physics D: Applied Physics* 50.193001.

Zhou, S., K. Zhao, eta H. Shen. (2020). Ablation of gold film on different substrates by ultrafast laser. *Optics Laser Technology* 132.106495.

Efektuei Bideratutako Analisia ospitaleko efluenteetan disruptore endokrino potentzialen detekziorako legamia bidezko *in-vitro* biosaioaz baliatuz

Lopez-Herguedas, N.[1], Cano, A., González-Gaya, B.[1,2], Álvarez-Mora, I.[1,2], Mijangos, L.[1,2], Olivares, M.[1,2], Prieto, A.[1,2], Etxebarria, N.[1,2] eta Zuloaga, O.[1,2]

1. Kimika Analitikoa Saila (Euskal Herriko Unibertsitatea, Leioa, Euskal Herria), 2. Plentziako Itsas Estazioa (Euskal Herriko Unibertsitatea, Plentzia, Euskal Herria)
naroa.lopez@ehu.eus

Laburpena

Ospitale efluenteak urgaineratutako kutsatzaileen ingurumeneko agerpenaren erantzule nagusietako bat kontsideratzen dira izaten dituzten farmako eta disruptore endokrino kontzentrazio altuak kontuan izanda. Lan honetan, efektuei bideratutako analisi (EDA) estrategia erabiltzen da bizkaiko ospitale bateko efluenteko aktibitate estrogenikoaren erantzuleak izan daitezkeen konposatuak identifikatzeko asmoz, zatikatze teknikak, legamia bidezko in-vitro biosaio bat eta susmagarrien analisia konbinatuz. Aktibitatea erakutsi duten frakzioetan detektatu diren estrogenizitatearen hautagaien artean bibliografian disruptore endokrino bezala nabarmendutako zenbait konposatu detektatu dira, hala nola, A bisfenola (1452 ng/L), butilparabenoa (37 ng/L), diurona (3.2 ng/L) eta progesterona (52 ng/L).

Hitz gakoak: disruptore endokrinoak, efektuei bideratutako analisia, ospitale efluentea, kutsatzaile emergenteak

Abstract

Hospital effluents contribute to the occurrence of emerging contaminants in the environment due mainly to their high load of pharmaceutical active compounds and some endocrine disrupting compounds (EDCs). In this study, an effect-directed analysis (EDA) approach has been performed in order to identify the compounds potentially responsible of the endocrine disruption activity in a hospital effluent from Biscay combining fractionation techniques, a recombinant yeast (A-YES) in-vitro bioassay and suspect screening approach. Among the potential candidates for the estrogenic effects of the bioactive fractions, different compounds with known estrogenic activity were detected, including, bisphenol A (1452 ng/L), butylparaben (37 ng/L), diuron (3.2 ng/L) and progesterone (52 ng/L).

Keywords: endocrine disrupting compounds, effect-directed analysis, hospital effluent, emerging contaminants

1. Sarrera eta motibazioa

Azken mendeotan giza biztanleriaren aktibitatearen gorakadaren eraginez, zenbait produktu kimikoen ekoizpen eta erabilerak sekulako igoera jasan du. Izan ere, produktu kimikoen produkzio globalaren hazkuntza nabaria izan da: 30. hamarkadan urtean 1 milioi tona ekoiztetik 400 milioi tonako zifrak lortzera mende honen hasieran (Bijlsma et al., 2016). Horren eraginez, kutsatzaileak etengabe isurtzen dira ekosistemarentzat edota gizakion osasunerako kaltegarriak suertatu daitezkeelarik.

Azken urteetara arte, zientzialarien kezka lehentasunezko kutsatzaile iraunkorrei bideratuta egon da, eta erakunde desberdinek (Europako Ingurumen Agentziak, EEAk, eta Estatu Batuetako Ingurumenaren Babeserako Agentziak, EPAk, esaterako) euren ezaugarri fisiko-kimikoetan, iraunkortasunean, bioakumulazioan eta eragin ditzaketen arriskuetan oinarrituta konposatu horiek zerrendatu eta legeztatu dituzte. Bestetik, zehazki uraren segurtasunari dagokion legedirik garrantzitsuenak Europar Batasuneko Uraren Zuzentarauak (*Water Framework Directive* delakoa, WFD 2013/39/CE) biltzen ditu. Gaur egun, ordea, urgaineratutako kutsatzaile edo kutsatzaile emergenteak dira ikerketa gehienen jomuga. Kutsatzaile talde heterogeneo honetako parte dira gaur egun horrenbeste erabiltzen diren farmakoak eta zaintza pertsonalerako produktuak (*pharmaceuticals and personal care products*, PPCPak), disruptore endokrinoak, pestizidak, erabilera industrialeko desinfektatzaile eta

produktuak eta nanomaterialak, besteak beste. Kutsatzaile emergenteek lehentasunezkoek baino toxikotasun eta iraunkortasun baxuagoa duten arren, euren etengabeko baliatze eta izaera kimiko polarragatik ingurune akuatikoan erraz sakabanatzeak egiten ditu hain erakargarri analisirako. Araututa ez dauden arren, euren ezinbesteko monitorizazioa dela eta, aipatutako ingurumen erakundeek konposatu hauen zerrenda dinamikoak garatu eta argitaratu dituzte, zeinetara aldiro-aldiro kutsatzaileak gehitzen diren.

Sarritan tratatu gabeko ur-isurketetan aurki daitezkeen kutsatzaile hauek hirietako ur-hondakinekin batera araztegietara iristen dira. Ohiko araztegietako tratamenduen bitartez euren erabateko eliminazioa ematen ez denez, ekosistema akuatikora heltzen dira organismo desberdinetan kalte ekotoxikologikoak eraginez (Verlicchi et al., 2010). Ur-araztegietatik ingurumenera isurtzen den uraren monitorizazioa egitea ohikoa bada ere, ospitaleen efluenteek ere arreta berezia behar dute. Herrialde gehienetan gertatzen den bezala, farmako eta garbiketa produktuen kontzentrazio arbuiagarria ez duten ospitaletako efluente horiek hirietako ur-hondakin gisa tratatzen dira (Orias et al., 2014), kontuan izan gabe ur horietan aurki daitekeen kutsatzaile kontzentrazioa nabarmen handiagoa izan daitekeela (Verlicchi et al., 2010). Beraz, azpimarratzekoa da ospitale efluente hauetan presente dauden urgaineratutako kutsatzaileen arrisku-ebaluazioaren beharra.

2. Arloko egoera eta ikerketaren helburuak

Urgaineratutako kutsatzaileek organismo desberdinetan eragin ditzaketen efektuen artean, sistema endokrinoa erasotzen duten konposatuak (*endocrine disrupting compounds* delakoak, EDCak) nabarmentzen dira. Asko dira EDC bezala sailkatu diren konposatu kimikoak; hala ere, gutxi batzuen aktibitatea soilik ikertu da. Horien artean, Europar Komisioak garatutako zerrendan, alkilfenolak, A bisfenola (BPA) eta ftalato esterrak, zenbait pestizida, estrogeno eta PPCP aurki daitezke (Ros et al., 2016).

Aipatutako konposatu horiek eragin ditzaketen kalte ekotoxikologikoak azaltzeko asmotan ezinbestekoa da kimika eta biologia arloen bateratzea. Bateratze honen adibide dugu azken urteotan garrantzi handia hartu duen estrategia: Efektuei Bideratutako Analisia (*Effect-Directed Analysis* delakoa, EDA), hain zuzen. EDAk kausa-efektu erlazioen azalpena errazteaz gain, laginaren zatikatzearen bidez matrizearen konplexutasuna murriztea du helburu (Brack et al., 2016). Prozesu iteratibo bat izanik, nahi adina aldiz zatikatzen da lagina, konposatu estrogenikoen isolamendua hobetzeko, eta era horretan, haien identifikazioa errazteko. Bestetik, toxikotasuna eragiten duten kutsatzaileak analisi bideratuarekin bakarrik identifikatzea erronka latza denez, EDAren estrategian susmagarrien analisia erabiltzen da ezagunak diren sustantziak biltzen dituen zerrendez baliatuz (Brack et al., 2016).

Laginaren toxikotasuna aztertzeko biosaio andana (*in-vitro* edo *in-vivo*) erabili daitezke, neurtu nahi dugun erantzun biologikoaren arabera egokiena aukeratuz beti ere (Brack et al, 2016). EDAn, orokorrean, *in-vitro* biosaioak erabiltzen dira, espezifikoagoak izateaz gain, errepikakorragoak, denboraz motzagoak eta merkeagoak direlako (Brack et al., 2011). Haatik, *in-vivo* biosaioen kasuan lortutako emaitzak kutsatzaileek organismoetan edota ekosisteman eragin ditzaketen kalteekin alderatuta errealagoak direla ez dago zalantzarik. Disruptore endokrinoen identifikaziorako gehien erabili den biosaioa legamia bidezko estrogenoen screening *in-vitro* biosaioa (*yeast estrogen screening* delakoa, YES) da (Rutishauser et al., 2004). Biosaio hau aktibitate estrogenikoa neurtzeko espezifikoa, azkarra eta erraza izateagatik, hainbat EDA ikerketetan erabili da (Chen et al., 2016; Smital et al., 2011).

Orain arte aipatutakoa kontuan hartuta, lan honen helburua Bizkaiko ospitale batean disrupzio endokrinoaren eragile izan daitezkeen konposatuen identifikazioa da, horretarako EDA estrategiaz baliatuz.

3. Ikerketaren muina

3.1. Laginketa eta laginen analisia

Laginketarako fase solidozko erauzketan oinarritzen den bolumen handitarako lagin-bilgailu automatiko bat erabili da, 45 L lagin hartu eta aurre-kontzentratu direlarik. Aurrekontzentrazio faktore hori *relative enrichment factor* (REF) bezala ezagutzen da.

Laginaren aktibitate toxikologikoa neurtzeko A-YES biosaioa aplikatu da laginaren aurre-kontzentrazio desberdinetan, era honetan, kontzentrazio efektiboak (ECak) aurkitzeko. Lan honetan, *Arxula adeninivorans* legamiaren modifikatutako andui bat erabili da. 96 putzuko plakak 48 orduz inkubatzen dira, 30 °C-tan kanpaidun irabiagailu orbital batean, 420 bira minutuko abiaduran. Behin inkubazio-denbora pasata, aktibitate estrogenikoa espektrofotometria bidez determinatzen da absorbantzia uhin-luzera desberdinetan neurtuz. Laginaren aktibitate estrogenikoa neurtzeaz gain, frakzio guztiak biltzen dituen lagin bateratuaren aktibitatea neurtu da kontzentrazio maila berdinetan, zatikatzeak laginaren berezko toxikotasunean eraginik ez duela frogatzeko.

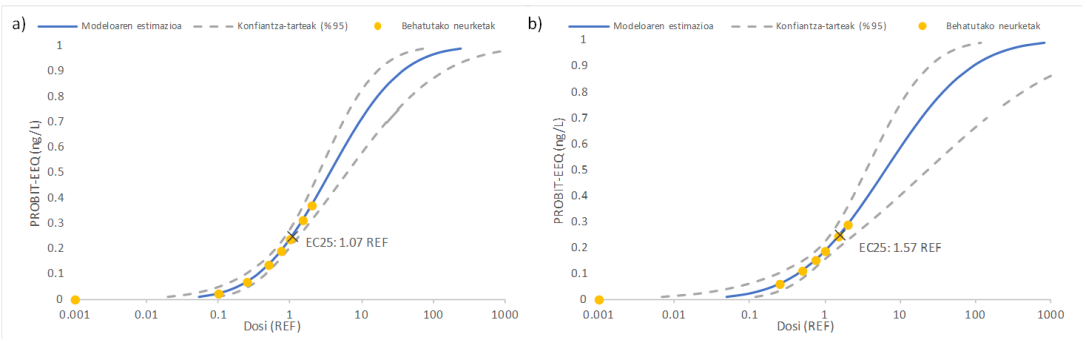
Laginaren aktibitate estrogenikoa frogatuta, laginaren bi zatikatze ortogonal burutu dira konposatuak euren polaritatearen arabera 18 (1. zatikatzean) eta 16 (2. zatikatzean) frakziotan banatuz. EDA estrategiari jarraiki, frakzio bakoitzaren estrogenizitatea neurtu da A-YES biosaioaren bitartez, frakzio ez-aktiboak alde batera utziz. Aktibitate estrogenikoa erakutsi duten frakzioak dira kimikoki analizatu direnak.

Analisi kimikorako, lagina bera zein frakzio desberdinak likido-kromatografia-masa-espektrometriaren bidez analizatu dira. Susmagarrien analisirako, eta baita ondoren konposatuak konfirmatzeko egin den analisi bideraturako, bereizmen altuko tandem masa-espektrometria erabili da, Thermo Scientific etxeko Q Exactive Focus kuadrupolo-Orbitrap masa-espektrometro hibridoari lotutako Thermo Scientific Dionex UltiMate 3000 ultrabereizmeneko likido-kromatografoan.

3.2. Konposatu estrogenikoen identifikazioa

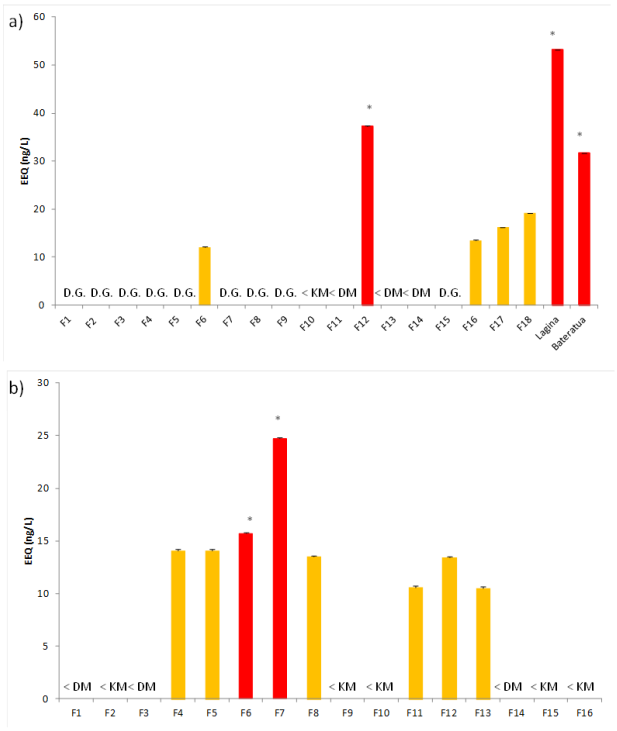
1. irudian ikus daitekeenez, ospitaleko efluenteak aktibitate estrogenikoa erakutsi du aztertutako aurrekontzentrazio maila guztietan. Emaitza horien arabera, kontzentrazio efektiboa %25ean edo 1.07 REF balioan dagoela determinatu da. Hori kontuan izanda, esan daiteke ospitaleko lagina hartzerako orduan jada aktibitate estrogenikoa eragiten zuela EC_{25} mailan. Bestetik, lagin bateratuarentzat EC_{25} maila 1.57 REF-ean lortu da 1. irudian ikus daitekeen bezala. Bi laginen balioak alderatuta, esan daiteke antzeko balioak direla % 25-eko leiho barruan, eta beraz, laginaren zatikatzean ez dagoela toxikotasun galera esanguratsurik.

1. irudia. PROBIT bidez lortutako dosi-erantzun kurba eskala logaritmikoan ospitaleko efluenteko laginarentzat (a) eta lagin bateratuarentzat (b) neurtutako E2 kontzentrazio baliokidean (EEQ, ng/L). Lerro jarraiak kontzentrazio efektibo (EC) balioak irudikatzen ditu, lerro etenek aldiz, konfiantza maila (% 95).



Lehenengo zatikatzean lortutako frakzioak laginaren EC_{25} baliorako kontzentrazioa abiapuntu bezala hartuta aztertu dira, kasu honetan, REF 2-ko kontzentrazioan. Aztertutako frakzio desberdinen aktibitate estrogenikoa 2. irudian ikus daiteke. Frakzio estrogenikoen artean 12. frakzioa gailendu da, lagina eta lagin bateratuaz gain, besteekiko estrogenizitate esanguratsua erakutsiz (p balioa > 0.05, Kruskal-Wallis) (2. irudia, a). Frakzio estrogenikoaren eta bi bizilagunen arteko nahastea berriro zatikatu ondoren lortutako 16 frakzio desberdinen aktibitate estrogenikoa neurtzerakoan aldiz, 6. eta 7. frakzioek erakutsi dituzte aktibitate esanguratsuak (p balioa > 0.05, Kruskal-Wallis) (2. Irudia, b).

2. irudia. Burututako zatikatzeetan lortutako frakzioetan neurtutako E2 baliokide kontzentrazioak (EEQ, ng/L) eta desbideratze estandarrak: lehenengo zatikatzea, REF 2 (a) eta bigarren zatikatzea, REF 5 (b). Izartxodun frakzioak aktibitate estrogeniko esanguratsua aurkeztu dutenak. D.G., detektatu gabea;DM, detekzio-muga; and KM, kuantifikazio-muga.



Analisi kimikoa, beraz, frakzio estrogenikoetan zein laginean eta lagin bateratuan aurrera eraman da, era horretan, estrogenizitatea eragiten zuten konposatu hautagaiak identifikatzeko.

Susmagarrien analisian detektatu diren hautagai guztietatik, 33 izan dira identifikazio irizpideak gainditu dituztenak. Gainera, bi frakzionamenduetan aktibitatea erakutsi duten frakzioetan presente egotea ere aintzakotzat hartu da. Schymanski eta lankideek adierazitako identifikazio-mailetan (Schymanski et al., 2014) oinarrituta identifikatutako hautagaiei identifikazio-mailak ezarri zitzaizkien, 1. maila identifikazio maila gorena eta 5. maila baxuena izanik.

Estrogenizitatearen erantzule potentzialak berresteko hautagaien analisi bideratua burutu da, horrela laginean kuantifikatu ahal izateko. Kuantifikatutako kutsatzaileak osotara lau izan dira: BPA plastifikatzaile ezaguna izan da kontzentrazio altuenean detektatutakoa (1452 ng/L), janari aditibo edota kosmetikoetan erabiltzen den butilparabenoa 37 ng/L-ko kontzentrazioan, diuron herbizida 3,2 ng/L-tan eta azkenik, progesterona sexu hormona 52 ng/L-tan. Aipatu beharra dago lau konposatu hauek disruptore endokrino bezala nabarmenduta agertzen direla bibliografian (Hashmi et al., 2020; Liu et al., 2018; Rutishauser et al., 2004; Kamarudin et al., 2020).

4. Ondorioak

Lan honetan efektuei bideratutako analisia (EDA) burutu da Bizkaiko ospitale baten efluenteko disruptore endokrino potentzialen analisirako, fase solidozko erauzketan oinarritzen den bolumen handitarako lagin-bilgailu automatiko bat, bi frakzionamendu ortogonal, A-YES biosaioa eta susmagarrien analisia elkar konbinatuz. Lortutako emaitzekin argi ikusten da EDA estrategia egokia dela aktibitate estrogenikoaren erantzule izan daitezkeen konposatuen detekziorako, izan ere, A-YES biosaioaren bitartez frakzio estrogenikoenak identifikatu dira. Aldi berean, susmagarrien analisiak laginean eta frakzio aktiboetan aurkitzen diren konposatu estrogeniko potentzialak identifikatzea ahalbidetu du, konposatu horien artean BPA, butilparabenoa, diurona eta progesterona aurkitzen direlarik. Bestetik, aipatu beharra dago garatutako EDA protokoloak ingurumenarentzat toxikoak izan daitezkeen konposatu orokorren identifikazioa ahalbidetzen duela hain zehatzak ez diren biosaioen erabileraren bitartez, hala nola, itsas-triku enbrioien edota zebra arrain enbrioien biosaioak erabiliz.

5. Etorkizunerako planteatzen den norabidea

Lan hau amaitutzat jotzeko laginaren aktibitate estrogenikoaren erantzule nagusiak identifikazio kimiko bitartez konfirmatzea eta hautagai bakoitzaren estrogenizitate osoarekiko ekarpena determinatzea falta da. Bestetik, matrize konplexu hauetan hain ohikoak diren efektu sinergiko eta antagonikoak aztertzea beharrezkoa dela nabarmendu da, horrela toxikotasunaren erantzule guztiak baieztatzeko.

6. Erreferentziak

Bijlsma, N.; Cohen, M. M. (2016) : Environmental Chemical Assessment in Clinical Practice: Unveiling the Elephant in the Room. *Int. J. Environ. Res. Public. Health,* 13 (2), 181.

Brack, W.; Ankley, G. T. (2011) : *The Handbook of Environmental Chemistry: Effect-Directed Analysis of Complex Environmental Contamination.* Springer, Heidelberg.

Brack, W.; Ait-Aissa, S.; Burgess, R. M.; Busch, W.; Creusot, N.; Di Paolo, C.; Escher, B. I.; Mark Hewitt, L.; Hilscherova, K.; Hollender, J.; Hollert, H.; Jonker, W.; Kool, J.; Lamoree, M.; Muschket, M.; Neumann, S.; Rostkowski, P.; Ruttkies, C.; Schollee, J.; Schymanski, E. L.; Schulze, T.; Seiler, T.-B.; Tindall, A. J.; De Aragão Umbuzeiro, G.; Vrana, B.; Krauss, M. (2016) : Effect-Directed Analysis Supporting Monitoring of Aquatic Environments – An in-Depth Overview. *Sci. Total Environ.* 544, 1073-1118.

Chen, X.-W.; Zhao, J.-L.; Liu, Y.-S.; Hu, L.-X.; Liu, S.-S.; Ying, G.-G. (2016) : Evaluation of Estrogenic Activity in the Pearl River by Using Effect-Directed Analysis. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 23 (21), 21692-21702.

Hashmi, M. A. K.; Krauss, M.; Escher, B. I.; Teodorovic, I.; Brack, W. (2020) : Effect-Directed Analysis of Progestogens and Glucocorticoids at Trace Concentrations in River Water. *Environ. Toxicol. Chem.* 39 (1), 189-199.

Kamarudin, N. A.; Zulkifli, S. Z.; Azmai, M. N. A.; Abdul Aziz, F. Z.; Ismail, A. (2020) : Herbicide Diuron as Endocrine Disrupting Chemicals (EDCs) through Histopathalogical Analysis in Gonads of Javanese Medaka (Oryzias Javanicus, Bleeker 1854). *Animals.* 10 (3), 525.

Liu, Y.-Y.; Lin, Y.-S.; Yen, C.-H.; Miaw, C.-L.; Chen, T.-C.; Wu, M.-C.; hsieh, C.-Y. (2018) : Identification, Contribution, and Estrogenic Activity of Potential EDC sin a River Receiving Concentrated Livestock Effluent in Southern Taiwan. *Sci. Total Environ.* 636, 464-476.

Orias, F.; Perrodin, Y. (2014) : Pharmaceuticals in Hospital Wastewater: Their Ecotoxicity and Contribution to the Environmental Hazard of the Effluent. *Chemosphere.* 115, 31-39.

Ros, O.; Vallejo, A.; Olivares, M.; Etxebarria, N.; Prieto, A. (2016) : Determination of Endocrine Disrupting Compounds in Fish Liver, Brain, and Muscle Using Focused Ultrasound Solid-Liquid Extraction and Dispersive Solid Phase Extraction as Clean-up Strategy. *Anal. Bioanal. Chem.* 408 (21), 5689-5700.

Rutishauser, B. V.; Pesonen, M.; Escher, B. I.; Ackermann, G. E.; Aerni, H.-R.; Suter, M. J.-F.; Eggen, R. I. L. (2004) : Comparative Analysis of Estrogenic Activity in Sewage Treatment Plant Effluents Involving Three In Vitro Assays and Chemical Analysis of Steroids. *Environ. Toxicol. Chem.* 23 (4), 857-864.

Schymanski, E. L.; Jeon, J.; Gulde, R.; Fenner, K.; Ruff, M.; Singer, H. P.; Hollender, J. (2014) : Identifying Small Molecules via High Resolution Mass Spectrometry: Communicating Confidence. *Environ. Sci. Technol.* 48 (4), 2097-2098.

Smital, T.; Terzic, S.; Zaja, R.; Senta, I.; Pivcevic, B.; Popovic, M.; Mikac, I.; Tollefsen, K. E.; Thomas, K. V.; Ahel, M. (2011) : Assessment of Toxicological Profiles of the Municipal Wastewater Effluents Using Chemical Analysis and Bioassays. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 74 (4), 844-851.

Verlicchi, P.; Galletti, A.; Petrovic, M.; Barceló, D. (2010) : Hospital Effluents as a Source of Emerging Pollutants: An Overview of Micropollutants and Sustainable Treatment Options. *J. Hydrol.* 389 (3-4), 416-428.

7. Eskerrak eta oharrak

Lan hau Espainiako Ekonomia eta Lehiakortasun Ministeritzak diruz lagundu du CTM2017-84763-C3-1-R proiektuaren bitartez. Bestalde, N. Lopez-Herguedas eta B. González-Gaya ikerlariek eskerrak eman nahi dizkiete Espainiako Ekonomia eta Lehiakortasun Ministeritzari euren doktoretza aurreko eta ondorengo laguntzengatik, hurrenez hurren.

Irudi-analisi eta machine learning bidezko itsas-triku enbrioi biosaioaren automatizazioa

Alvarez-Mora, I.[1,2], Mijangos, L.[1,2], Lopez-Herguedas, N.[1,2], Eguiraun, H.[2,3], Amigo, J.M.[1,2], Monperrus, M.[4], Etxebarria, N.[1,2]

1. Kimika Analitikoa Saila (Euskal Herriko Unibertsitatea, Leioa, Euskal Herria)

2. Plentziako itsas estazioa (Euskal Herriko Unibertsitatea, Plentzia, Euskal Herria)

3. Adierazpen Grafikoa eta Ingeniaritzako Proiektuak Saila (Euskal Herriko Unibertsitatea, Bilbao, Euskal Herria)

4. Institut des Sciences Analytiques et de Physico-chimie pour l'Environnement et les matériaux (Université de Pau et des Pays de l'Adour, Pau, France)

Iker.alvarez@ehu.eus

Laburpena

Zorionez, sortutako kutsatzaileengan jarritako arreta gero eta handiagoa da, era horretan, horien helmena eta eragin ditzaketen efektuak ikertzeko eta aldez aurretik ezagutzeko. Ingurumen lagin konplexuen kausa-efektu erlazioak azaltzeko analisi kimiko eta toxikologikoaren bateratzea beharrezkoa dela ondorioztatu da. Efektuei Bideratutako Analisia (EDA, effect-directed analysis) bateratze horren adibide garbia da, kutsatzaile nahasketa konplexuetan egon daitezkeen konposatu toxikoen identifikazioa errazten duelarik. Lan honetan, EDA metodologietan aplika daitekeen itsas-triku biosaioaren automatizazioa proposatzen da irudi analisia eta ikasketa automatikoko tresnak erabiliz, prozesuaren lan-karga eta denbora murrizteko. Jatorriko biosaioan neurtzen diren hazkuntza eta alterazio maila, modu automatiko batean neurtzea lortu da, irudi-irakurle baten bidez argazkiak automatikoki atera ondoren. Prozesua MATLABen programatutako kodearen bitartez lortu da, eta aplikazio batean bildu da, programazio ezaguerarik ez dituztenek jarraitu ahal izateko.

Hitz gakoak: ekotoxikologia, itsas-triku enbrioi testa, automatizazioa, irudi-analisia, ikasketa-automatikoa, efektuei bideratutako analisia.

Abstract

Hopefully, the efforts done in the last years give us a better idea of the contaminant's fate and their effects. However, elucidating the cause-effect relations of complex contaminants mixtures is not an easy task. Usually, chemical analysis techniques are coupled to ecotoxicological bioassays in complex pipelines such us Effect Directed Analysis (EDA). This kind of pipelines have a clear drawback, their workload, that make the methodology hard to apply when the sample amount is too big. In this work, the automatization of a bioassay, the sea-urchin embryo test (SET), is proposed to be used in an EDA approach. The endpoints measured in the original sea-urchin embryo test were automatized using an image reader, image analysis and machine learning. All the scripts used for this task were compiled to create an app, available for any type of user.

Keywords: ecotoxicology, sea-urchin embryo test, automatization. image-analysis, machine learning, effect directed analysis.

1. Sarrera eta motibazioa

Azkenengo urteetan, ingurumenera isurtzen diren hondakinen karakterizazio kimikoa hobeto ulertzeko egin diren aurrerakuntzei esker, kutsatzaile azpi-talde berri bat izendatu da, ingelesez *Contaminants of Emerging Concern* edo CEC bezala ezagutzen dena. Askotan kutsatzaile emergente bezala ezagutzen badira ere, kasu askotan berria dena ez da kutsatzaile hauen presentzia ingurumenean, baizik eta hauekiko sortutako kezka. Multzo horretan sartzen diren konposatuak erregulazio edo arautik kanpo daude eta haien artean aurkitzen ditugu eguneroko bizitzan erabilitako zainketa pertsonalerako produktuetatik, medikamentuetara; industria-produktuetatik, nekazaritzan erabiltzen diren pestizidetara. Behin bere funtzioa bete ondoren,

konposatu hauek ur-araztegietan edo zuzenean ingurumenean amaitzen dute. CEC-ei buruzko hainbat ikerketen emaitzek erakutsi dute araztegiak ez direla gai kutsatzaile hauek eliminatzeko, araztegiko efluenteak kutsatzaile zopa bat direla frogatuz (Loos et al., 2013).

Erronka ekotoxikologikoak, kutsatzaile nahasketa konplexu honetan datza, hain zuzen. Kutsatzaileen arrisku-ebaluaziorako hamaika biosaio erabiltzen diren arren (Brack et al., 2016), *in-vivo* zein *in-vitro,* hauek ezer gutxi argitzen digute aurkitutako efektu toxikologikoen jatorriari buruz. Hori dela eta, *in-vivo* biosaioak askotan analisi kimikoko teknikekin batera erabiltzen dira, kausa-efektu erlazioak azaldu nahian. Estrategia hauen artean adibide nagusia, Efektuei Bideratutako Analisia (*Effect Directed Analysis,* EDA) da (Burgess et al., 2013). Erabilitako estrategia edozein izanda, kausa-efektuak ulertzeko prozesua geldoa eta lan-karga handikoa da.

Zientzia doan erritmora, denbora galtzea ez da aukera bat. Erlojuaren aurkako lehia oso presente dago zientzialariaren bizitzan. Emaitza egokiak ematea bezain garrantzitsua da gaur egun, hauek, azkar ematea, hau da, segundora optimizatzea emaitzen eskurapena; batez ere, behin baino gehiagotan errepikatzen diren prozesuez mintzatzerako orduan. Prozesu errepikakor hauen optimizazioan eta automatizazioan datza, hain zuzen, modan dauden HTS (*High-Throughput Screening*) metodoak. Metodo hauek robotikaz, datu prozesamendu softwarez, etab.-ez baliatzen dira, modu tradizional batean luze joko lukeen prozesu bat minutu gutxi batzuetan aurrera eramateko.

2. Arloko egoera eta ikerketaren helburuak

Aipatutako EDA metodologiaren barruan, hainbat biosaio erabili daitezke laginaren toxikotasun efektuak aztertzeko. Aztertu nahi den erantzunaren arabera, espezifikoak diren testak (adibidez, disrupzio endokrinoa aztertzeko *Yeast Estrogen Screen*, YES) (Rutishauser et al., 2004), organismo baten gainean hainbat *´endpoint´* aztertzen dituzten test ez-espezifikoak (adibidez, zebra-arrain enbrioi testa, ZFET)(OECD, 2013), toxikotasun erreaktiboa neurtzen duten testak (adibidez, Ames testa, mutagenizitatea neurtzeko) edota haien konbinazioak aurki ditzakegu EDAn (Escher et al., 2011). Era berean, oso garrantzitsua da aukeratutako biosaioan erabiltzen den espeziea aztertzen ari den ingurumenerako adierazgarria izatea.

Lerro horretan, itsas-triku enbrioi testa edo SET (*Sea-urchin Embryo Test*) itsas-ingurumenerako biosaio esanguratsuenen artean dago. Euskal Herriko kostaldean aurkitzeko aukerak eta akuarioetan hazteko erraztasunak, gure kostaldeko ekosistema aztertzeko ezinbesteko espeziea bilakatzen dute itsas-trikua (Mijangos et al., 2020). Entsegu honetan, kutsatzaileei esposatutako enbrioien hazkuntza eta malformazioak aztertzen dira 48 orduz inkubatu ondoren. Alderantzizko mikroskopioaren bidez, larben tamaina banaka neurtzen da eta Carballeira et al.-ek proposatutako lau alterazio mailen artean sailkatzen dira (Carballeira et al., 2012) (0. maila garapen normaleko larbak definitzeko; 1. maila eskeletoko erpina malformatuta duten larbak; 2. maila eskeletoaren malformazio nagusiak dituztenak; eta 3. maila garapen oso murriztua izan duten larbak). Maila bakoitzari indize bat aplikatuz, larben kontaketa egiten da eta toxikotasun indizea (IT) kalkulatu daiteke ondorengo ekuazioan (1) azaltzen den bezala:

$$IT = [0 \times \%\, 0.maila + 1 \times \%\, 1.maila + 2 \times \%\, 2.maila + 3 \times \%\, 3.maila]/100 \qquad (1)$$

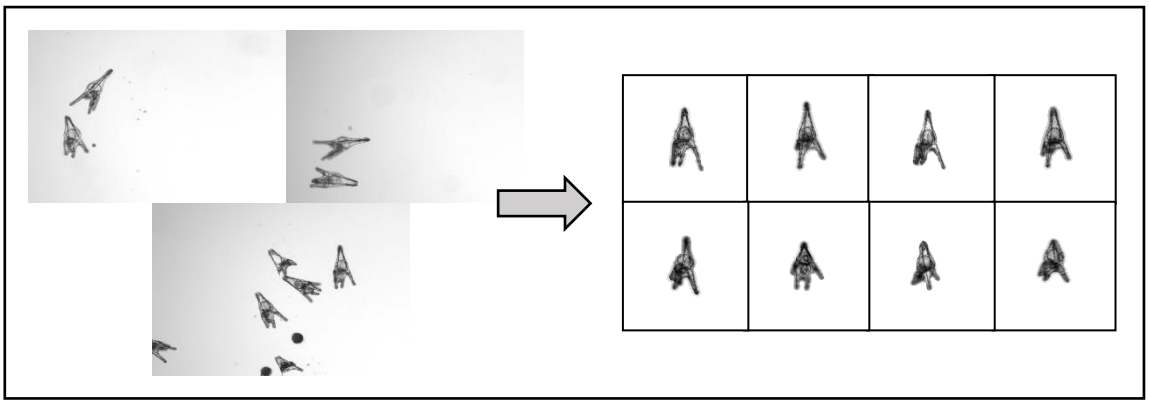
Lagin kopuruaren arabera egunak iraungo lituzkeen prozesu hau arintzea eta automatizatzea da, hain zuzen ere, lan honen helburu nagusia; irudi eskuratze automatikoaz, irudi-analisiaz eta ikasketa automatikoaz (*machine learning)* baliatuz.

3. Ikerketaren muina

3.1. Esposizio esperimentuak eta irudi prozesatzea

Aipatutako helburua lortzeko, esposizio esperimentuak gauzatu dira kutsatzaile desberdinekin, alterazio sorta zabal bat erakusten dituzten larben irudiak lortzeko. Albendazola, amitriptilina, kafeina eta kobre (II) kloruroa erabili dira esposiziorako, larbak 48 orduz eta 20 ℃-tan inkubagailuan inkubatu direlarik. Grisen-eskalako irudiak lortzeko Cytation™ 5 (4x handipen objektiboa, BIOTEK) irudi irakurgailua erabili da, plaka osoan zehar 16 argazkiko ekorketa eginez aurretiaz, larbak finkatzeko, formalina tanta bat gehitu den putzu bakoitzeko. Larben tamaina neurtzeko eta malformazio egoeraren arabera sailkatu ahal izateko irudiak prozesatu dira, hainbat larba agertzen diren irudi gordinetatik, larba bakoitza orientatuta eta zentratuta izan arte (ikus 1. Irudia).

1. irudia. Irudi prozesatzea irudi gordinetik irudi tratatuetara



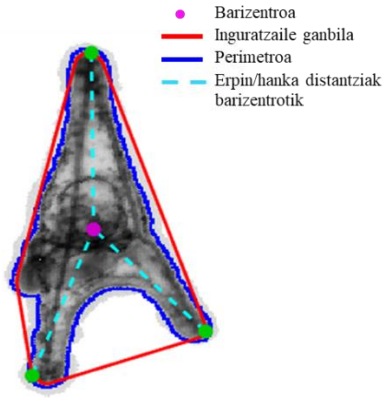
Irudi gordinetik larbak ateratzeko, jatorrizko irudietan pixel-intentsitate atalase bat ezarriz lortu diren irudi binarioetan dilatazioa aplikatu da, eta artefaktu txikiak eta ertzetako elementuak kendu dira. Gainerako objektuak, larbei dagokienak alegia, erabili dira irudi gordinetik hauek erauzteko, orientatzeko eta 500x400 pixeletako irudi berrietan normalizatzeko (dimentsio zehatzetako irudiak lortuz). Honela, 270 larben irudi-bilduma lortu da. Bilduma hori bitan banatu da, 240 irudirekin sailkapenerako eredua eta metodologiaren optimizazioa egiteko entrenamenduko sorta prestatuz; eta gainontzeko 30-ekin berriz, eredua berresteko sorta. Irudi prozesamendurako *MATLAB*-en garatutako kodigoa erabili da *Image Processing Toolbox*-eko zenbait funtzioz baliatuz.

3.2. Itsas-triku enbrioi testaren automatizazioa.

Esan bezala, lan honen muina SET biosaioa eguneratzean datza. Horretarako, kimiometriak, larba irudien sailkapena egiteko behar ditugun tresna guztiez hornitzen gaitu. Lan honetan *Partial Least Squares Discriminant Analysis* (PLS-DA) algoritmoaren bi moldaera konparatu dira, larbak Carballeirak proposatutako taldeen artean banatzeko. Irudi prozesamenduaren mugak direla eta, erdiko bi egoerak (1 eta 2 mailak) bateratu dira.

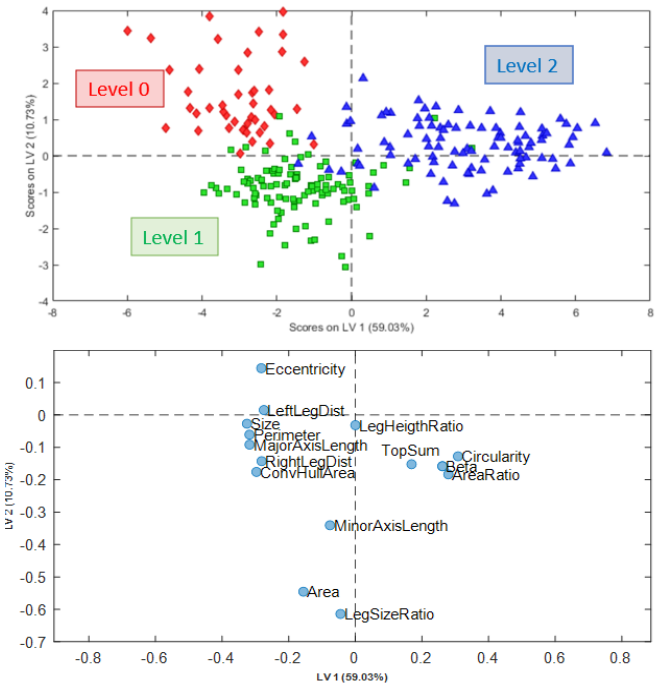
Sailkapen ereduekin sartu aurretik, hauetan erabiliko den datu sarrera lortu da. Irudien informazioarekin modu eraginkor batean lan egiteko, argazkiak parametrizatu dira. Larben egoera definitzen duten 17 parametro aukeratu dira, adibidez, larbaren luzera, zabalera, azalera, biribiltasuna, perimetroa, etab. (ikus 2. irudia). Entrenamendurako larba bakoitza parametrizatu ostean, sailkapen ereduak eraikitzeko erabiliko den 270x17-ko datu matrizea lortu da.

2. irudia. Larba irudien parametroen adibidiea



Larbak alterazio egoeraren arabera sailkatzeko gai den eredu bat eratzeko, lehenik, garrantzitsua da, adituen laguntzaz, kalibraziorako irudi sortaren sailkapena egitea. 240 argazkietatik 37, 0.mailan sailkatu dira, 107, 1.mailan eta 98, 2.mailan. Arestian aipatutako bi PLS-DA moldaera konparatu dira: lau aldagai latenterekin (59%, 11%, 9% eta 5%-ko bariantza azalduz, hurenez hurren) eraikitako 3 taldeko PLS-DA (ikus 3. irudia) eta bata bestearen atzean eraikitako PLS-DA hierarkikoa (HPLS-DA). HPLS-DA-ren kasuan, lehenengo 0. eta 1. mailak 2.-etik bereizi dira, eta ondoren, 0. eta 1. mailak bata bestearekiko.

3. irudia. Hiru talderekin eraikitako PLS-DA ereduaren Scores (goian) eta Loadings (behean) irudikapenak.



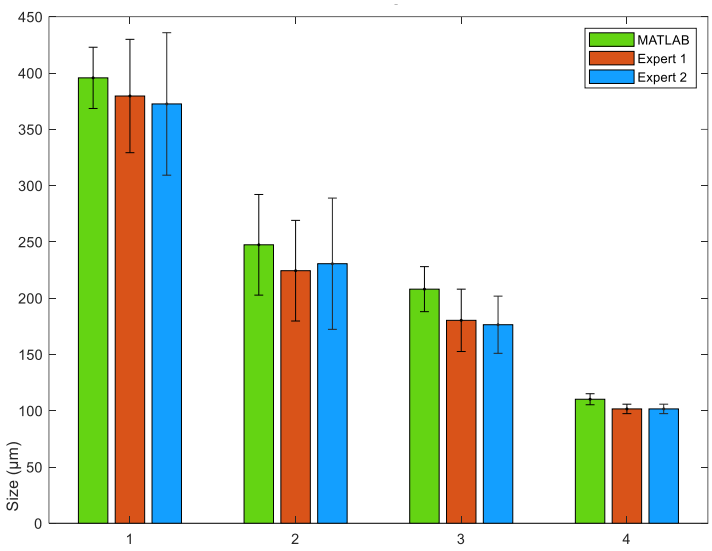
Eredu biak berretsi dira berrespenerako sortarekin, haien egokitasuna aztertu ondoren. 1. taulan ikus dezakegun bezala HPLS-DA ereduak sailkapenerako gaitasun hobea erakusten du, bai positibo eta negatibo faltsuak baztertzeko gaitasunari (zehaztasuna eta sentikortasuna, hurrenez hurren), bai iragarpen erroreari erreparatuz. Berrespenaren iragarpen erroretik ereduaren eta adituen arteko adostasun neurria lortu dezakegu, %84-koa.

1. taula. Konparatu diren bi sailkapenerako ereduen balidaziorako parametroak.

	HPLS-DA		PLS-DA	
	Kalibrazioa	Berrespena	Kalibrazioa	Berrespena
Sentikortasuna	0.916	0.844	0.908	0.806
Zehaztasuna	0.954	0.952	0.920	0.902
Iragarpenaren errorea	0.084	0.156	0.092	0.194

Itsas-triku enbrioi testaren automatizazioarekin amaitzeko, larben tamainaren neurketa automatizatu da. Prozesatutako irudien gainean aldenduen dauden bi pixelen arteko distantzia neurtu da. Ondoren, kalibratzeko erabili den eskaladun irudi baten laguntzaz, distantzia mikrometrotara pasatu da. Metodo hau berresteko, bigarren esperimentu bat egin da, hiru larba talde kobre (II) kloruro kontzentrazio desberdinekin esposatuz. Gero, talde bakoitzetik hartutako larbak, bi adituen laguntzaz eta garatutako metodoarekin neurtu dira aldi berean, euren artean konparatuz (ikus 4.irudia). Gainera, ernaldu bezain laster formalinarekin finkatutako arrautzen neurketak ere egin dira, hazkuntza kalkulatu ahal izateko (hazkuntza, larbaren tamainari arrautzaren tamaina kenduaz ematen da). Konparatutako hiru bideek ez dute desberdintasun adierazgarririk erakusten, era horretan, metodoaren egokitasuna erakutsiz.

4. irudia. Bi adituek eskuz neurtutako eta MATLAB-eko kodea aplikatuz neurtutako itsas-triku larben arteko konparaketa. 1. Taldea kobre (II) kloruro 0,01 mg·L^{-1}; 2. Taldea 0,1 mg·L^{-1}; 3.Taldea 0,5 mg·L^{-1} eta 4. Taldea arraultzei dagokie.



Automatizatutako biosaio hau benetan erabilgarria izateko eta programazioko ezagutzarik ez duen edozeinek erabili ahal izateko, aplikazio bat eraiki da. Argazki gordinak atera ondoren, aplikazioan irudi hauen jatorrizko karpeta aukeratzea nahikoa da, botoi bat sakatuz, lan honetan zehar azaldutako prozesu osoa martxan jartzeko. Behin irudien prozesatzea amaituta, bai neurketen bai sailkapenaren emaitzak grafiko zein taula moduan azaltzen dira.

4. Ondorioak

Gaur egun, ezinbestekoa da zenbait metodologia zaharberritzea. Lan honetan, lehen, 10 laginen toxikotasuna aztertzeko egunak behar zituen prozesua ordu gutxitan eta modu automatiko batean egiteko aukera erakutsi da. Emaitzei erreparatuz, hazkuntzan ez da inolako desberdintasunik aurkitu modu tradizionalarekin konparatuz. Sailkapenean aldiz, ikusi da %84-ko bat-etortzea dagoela adituen sailkapenarekin. Hala ere, kontuan hartu behar da, modu automatizatu honetan aditu desberdinen subjektibotasuna desagertzen dela, tresna errepikakorragoa bilakatuz.

5. Etorkizunerako planteatzen den norabidea

Metodologia garatu ondoren, lan honen hurrengo urratsa argi dago, kasu erreal batean aplikatzea. Eraikitako ereduaren sendotasuna baieztatzeko honen aplikagarritasuna aztertu behar da, batez ere, honelako teknologiarekin trebea ez den erabiltzailearentzat. Gainera, entsegu berriek, larba irudi bilduma handitzeko aukera ematen digute, eredua hobetuz.

6. Erreferentziak

Burgess, R. M., Ho, K. T., Brack, W., & Lamoree, M. (2013). Effects-directed analysis (EDA) and toxicity identification evaluation (TIE): Complementary but different approaches for diagnosing causes of environmental toxicity. *Environ. Toxicol. Chem.*, 32(9), 1935–1945.

Brack, W., Ait-Aissa, S., Burgess, R. M., Busch, W., Creusot, N., Di Paolo, C., Escher, B. I., Mark Hewitt, L., Hilscherova, K., Hollender, J., Hollert, H., Jonker, W., Kool, J., Lamoree, M., Muschket, M., Neumann, S., Rostkowski, P., Ruttkies, C., Schollee, J., … Krauss, M. (2016). Effect-directed analysis supporting monitoring of aquatic environments — An in-depth overview. *Sci. Total Environ*, 544, 1073–1118.

Carballeira, C., Ramos-Gómez, J., Martín-Díaz, L., & DelValls, T. A. (2012). Identification of specific malformations of sea urchin larvae for toxicity assessment: Application to marine pisciculture effluents. *Marine Environmental Research*, 77, 12–22.

Escher, B., & Leusch, F. (2011). *Bioanalytical Tools in Water Quality Assessment*. https://doi.org/10.2166/9781780400778

Loos, R., Carvalho, R., António, D. C., Comero, S., Locoro, G., Tavazzi, S., Paracchini, B., Ghiani, M., Lettieri, T., Blaha, L., Jarosova, B., Voorspoels, S., Servaes, K., Haglund, P., Fick, J., Lindberg, R. H., Schwesig, D., & Gawlik, B. M. (2013). EU-wide monitoring survey on emerging polar organic contaminants in wastewater treatment plant effluents. *Water Research*, 47(17), 6475–6487.

Mijangos, L., Krauss, M., de Miguel, L., Ziarrusta, H., Olivares, M., Zuloaga, O., Izagirre, U., Schulze, T., Brack, W., Prieto, A., & Etxebarria, N. (2020). Application of the Sea Urchin Embryo Test in Toxicity Evaluation and Effect-Directed Analysis of Wastewater Treatment Plant Effluents. *Environ Sci. & Technol*, 54(14), 8890–8899.

OECD (2013), Test No. 236: Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2, OECD Publishing, Paris,

Rutishauser, B. V.; Pesonen, M.; Escher, B. I.; Ackermann, G. E.; Aerni, H.-R.; Suter, M. J.-F.; Eggen, R. I. L. (2004) : Comparative Analysis of Estrogenic Activity in Sewage Treatment Plant Effluents Involving Three In Vitro Assays and Chemical Analysis of Steroids. *Environ. Toxicol. Chem.* 23 (4), 857-864.

7. Eskerrak eta Oharrak

Lan hau Espainiako Ekonomia eta Lehiakortasun Ministeritzak diruz lagundu du CTM2017-84763-C3_1_R proiektuaren bitartez. Bestetik, Autoreak eskerrak eman nahi dizkie Euskal Herriko Unibertsitateari (UPV/EHU) eta Université de Pau et des Pays de l'Adour-i (UPPA) doktoretza-aurreko diru laguntzagatik.

.

2 motako diabetesari asoziaturiko RNA ez-kodetzaile batek 2 transglutaminasa genearen adierazpena erregulatzen du pankreako beta zeluletan

Gónzalez-Moro, I.[1,2], Sebastián-delaCruz, M.[1,2], Rojas-Márquez, H.[1], Olazagoitia-Garmendia, A.[1,2], Mentxaka-Salgado, J.[1], Mendoza, L.M.[1], Lluch, A.[3], Ortega, F.J.[3], Castellanos-Rubio, A.[1,2,4,5], Santin, I.[1,2,4]

[1]*UPV/EHU,* [2]*Biocruces Bizkaia Health Research Institute,* [3]*IDIBGI,* [4]*CIBERDEM,* [5]*Ikerbasque.*

itziar.gonzalezm@ehu.eus

Laburpena

LOC107987281 izeneko RNA luze ez-kodetzailea (lncRNA) 2 motako diabetesarekin bat datozen hainbat parametrorekin asoziatua dago. Pankreako beta zeluletan *LOC107987281* nagusiki nuklearra dela ikusi genuen, transkripzioaren erregulazioan jardun dezakeenaren seinale izan daitekeelarik. Emaitza esperimentalek aditzera ematen dute lncRNA honek *TGM2* gene kodetzailearen adierazpena kontrolatzen duela. *TGM2* geneak intsulinaren jariapenean duen funtzioa kontutan izanik, eta lncRNAren eta 2 motako diabetesarekin (T2D; ingelesez *type 2 diabetes*) erlazionatutako zenbait parametroen artean dagoen asoziazioa ikusita, *LOC107987281* RNAk 2 motako diabetesarekin lotura izan dezakeela ondoriozta daiteke.

Hitz gakoak: TGM2, 2 motako diabetesa, lncRNA, pankreako beta zelula.

Abstract

A long non-coding RNA (lncRNA) called LOC107987281 is linked to several parameters related to type 2 diabetes. In pancreatic beta cells, LOC107987281 is preferentially expressed in the nuclei, suggesting a potential role in transcriptional regulation. Experimental data evoke this lncRNA is able to regulate the expression of TGM2 coding gene. Considering the function of TGM2 gene, this regulation seems to be relevant for proper insulin secretion and beta cell function in a T2D context, given the association of LOC107987281 with the aforementioned T2D related parameters.

Keywords: TGM2, Type 2 diabetes, lncRNA, beta cells

1. Sarrera eta motibazioa

Giza 2 transglutaminasa (TGM2) 686 aminoazido dituen entzima monomerikoa da, 20. kromosoman kokaturiko *TGM2* geneak kodetzen duena. Transamidazio erreakzioak katalizatzen dituen entzima honek G-proteina modura jardun dezake. Nahiz eta ehun gehienetan modu konstitutiboan adierazten den, bere transkripzioa estuki erregulatuta dago, kasu askotan hanturazko zitokina eta hazkuntza faktoreen bidez (Nurminskaya eta Belkin, 2012). Entzima hau giza pankreako irletan adierazten da eta karraskarietan intsulinaren jariapenean parte hartzen duela ikusi da.

TGM2ren funtzio nagusia Ca^{2+} menpeko proteinen arteko erretikulazioa gauzatzea da, glutamina aminoazidoen bitartez. Elkargurutzatutako proteinek, lotura itzulezin isopeptidiko horren bidez, masa molekular handiko produktuak eratzen dituzte eta zelula kanpoko matrizean, zelulen atxikipenean, proliferazioan, apoptosian eta beste prozesu anitzetan funtzio garrantzitsua betetzen dute (Nurminskaya eta Belkin, 2012). Horrela, ez da harritzekoa TGM2 funtzio akasdunak egoera patogenikoak sortaraztea; izan ere, TGM2 zenbait gaixotasunekin

inplikatu da, minbiziarekin eta gaixotasun autoimmuneekin, besteak beste (Rahauvirta et al, 2019).

TGM2 2 motako diabetesaren garapenarekin (T2D) erlazionatu da. 2 motako diabetesa gaixotasun endokrino bat da zeinean bi prozesu patogeniko ematen diren: alde batetik, pankreako beta zelulen intsulinaren ekoizpen eta jariapen desegokia, eta bestetik, ehun periferikoetan intsulinarekiko erresistentziaren agerpena (Chatterjee et al, 2017). Munduan zeharreko bizimodu sedentarioen eta gizentasunaren areagotze larri progresiboaren ondorioz T2Daren prebalentzia azken urteotan izugarri hazi da, eta erritmo handian areagotzen jarraitzea aurreikusten da (Chatterjee et al, 2017). Nahiz eta gaixotasun multifaktoriala izan, asoziazio eta lotura ikerketen arabera, faktore genetikoek berebiziko garrantzia dute bere garapenean. Zorigaitzez, badirudi osagai genetiko horretan polimorfismo edo bariante ohikoek eragin apala dutela banan-banan aztertzean, polimorfismo arraroagoek izan dezaketen garrantzia nabarmenduz. TGM2k karraskarien beta zeluletan glukosak eragindako intsulinaren jariapenean (GSIS; ingelesez *glucose-stimulated insulin release*) parte hartzen duela ikusi da. Izan ere, arratoien pankreako irlatxoak TGM2aren inhibitzaileekin inkubatzeak GSIS nabari murriztea eragiten du (Bungay et al, 1986). Are gehiago, *TGM2* genearen etenaldiak GSIS inhibitzen du, *TGM2*$^{-/-}$ diren arratoiak glukosarekiko intolerante bihurtzen direlarik (Bernassola et al, 2002).

Bestalde, T2D edo MODY (ingelesez; *maturity onset diabetes of the young*) duten pazienteetan TGM2 proteinaren kontserbazio altuko aminoazidoetan mutazio heterozigotoak identifikatu dituzte. Mutazio horiek TGM2ren transamidazio aktibitatea murrizten dutela ikusi da *in vitro* gauzaturiko esperimentuetan (Porzio et al, 2007). Gainera, arratoiaren intsulinoma zelula lerroetan (INS-1E), mutazio hauek glukosak eragindako intsulinaren jariapena murrizten dutela ikusi da (Salter et al, 2012).

Emaitza hauek *TGM2* geneak intsulinaren jariapenean, eta ondorioz, pankreako beta zelulen ohiko funtzioan daukan garrantzia erakusten dute, *TGM2* genearen erregulazio ondo ulertzea ezinbestekoa izanik. Berriki, zenbait zelula lerrotan gauzaturiko ikerketetan, *TGM2* genearen adierazpenarekin korrelazio zuzena duen RNA luze ez-kodetzaile (lncRNA; ingelesez *long non-coding RNA*) bat (*LOC107987281*) identifikatu da (Minotti et al, 2018). *LOC107987281* lncRNA, *TGM2*ren lehenengo introitik transkribatzen da eta 1000 nukleotidoz osatua dago (Minotti et al, 2018). LncRNA honek nukleotido bakarreko polimorfismo (SNP: ingelesez *single nucleotide polymorphism*) bat dauka bere lehenengo exoian, *TGM2* gene kodetzailean intronikoa dena.

Horrela, gure ikerketaren hipotesia, *LOC107987281*ren funtzioa aldatu dezaketen polimorfismoek *TGM2*aren adierazpena aldatu eta intsulinaren jariapenean eta T2Daren garapenean eragina izan dezaketela da.

2. Ikerketaren helburuak

Sarreran azaldutakoa abiapuntutzat hartuta, gure ikerketaren helburu nagusia *LOC107987281* RNA ez-kodetzailearen karakterizazio funtzionala burutzea da, 2 motako diabetesaren garapenean izan dezakeen ekarpena argitu nahian.

Asmo honekin, bi helburu espezifiko ezarri ditugu. Alde batetik, *LOC107987281* genean dagoen polimorfismoak T2D garatzeko arriskuan duen ekarpen espezifikoa determinatzea. Honetarako, giza laginetan SNPa eta T2Dren patogenesiarekin asoziaturiko zenbait parametroen arteko asoziazio ikerketa sortu dugu.

Beste aldetik, *LOC107987281* lncRNA eta TGM2aren erlazioa aztertzea pankreako beta zeluletan. Horretarako, *LOC107987281* lncRNAren adierazpena modulatuko dugu isilarazpen- eta gainadierazpen-tekniken bitartez, eta *TGM2*aren adierazpena zehaztuko dugu.

3. Ikerketaren muina

3.1. LOC107987281 lncRNA T2D-arekin asoziatuta dago

Lehendabizi, *LOC107987281*aren introian dagoen rs2076380 polimorfismoa analizatu zen 557 pertsonatako kohorte batean. Horren ostean, polimorfismoa eta T2Darekin erlazionatuta dauden zenbait parametroen arteko asoziazio-ikerketa burutu zen.

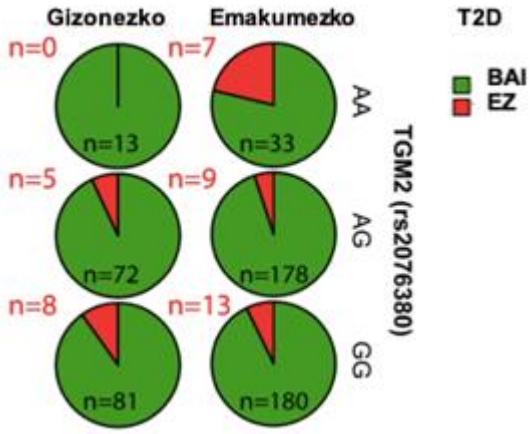
Gizonen laginen artean (n=166) emaitza esangarririk ikusi ez genuen arren, emakumeetan (n=391) polimorfismoa hainbat parametrorekin modu esanguratsuan asoziatuta zegoela ikus daiteke; hala nola, glukosa maila, intsulina maila barauan, 75gr glukosa irentsi eta 120minutu osteko intsulina maila eta intsulinarekiko erresistentzia (HOMA-IR) (1.taula).

1. taula. *LOC107987281*an dagoen rs2076380 polimorfismoaren eta diabetesarekin erlazionatutako zenbait parametroen arteko asoziazio ikerketaren emaitzak kohorteko emakumezkoetan.

rs2076380	AA (n=33)		AG (n=178)		GG (n=180)		ANOVA
	Bataz-bestekoa	Desbideraketa estandarra	Bataz-bestekoa	Desbideraketa estandarra	Bataz-bestekoa	Desbideraketa estandarra	
Glukosa (mg/dl)	106,0	30,4	95,2	16,5	93,8	19,7	0,005
INTSULINA barauan	31,8	20,0	21,0	12,4	19,3	11,9	0,001
INTSULINA (glukosa + 120min)	113,6	110,4	113,3	93,9	80,0	72,0	0,010
HOMA-IR	7,0	13,0	3,8	4,1	3,4	6,1	0,016

1. taulan ikusi daitekeen gisara, rs207380 polimorfismoan AA genotipo duten emakumeek intsulina jariapen altuagoa izateaz gain, intsulinarekiko erresistentzia adierazten duen HOMA-IR parametroa altuagoa eta odoleko glukosa maila ere altuagoa dute, AG heterozigotoak edo GG homozigotoak diren emakumeekin alderatuta.

1. Irudia. Aztertutako kohortean T2D duten norbanakoen proportzioa, rs2076380 genotipoaren arabera. AA genotipoa duten emakumeen artean T2Daren intzidentzia AG edo GG duten emakumeen artean baino altuagoa da, %21, %5 eta %7ko intzidentziarekin, hurrenez hurren.

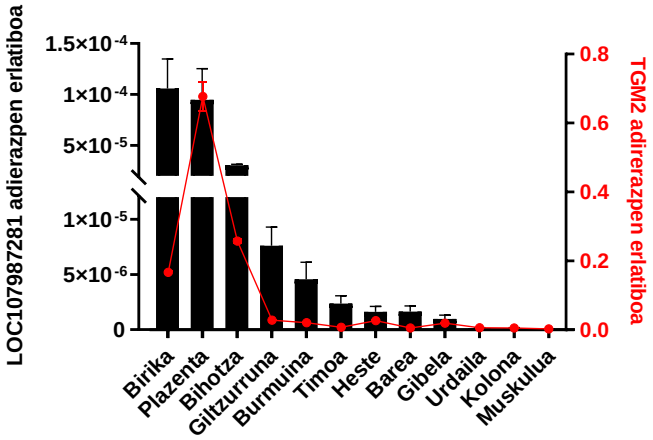


3.2. LOC107987281 lncRNA eta TGM2 gene kodetzailea giza ehun desberdinetan adierazten dira

Behin *LOC107987281* eta T2Daren arteko asoziazioa frogaturik, RNA ez kodetzailearen azterketari ekin genion. Lehendabizi, *TGM2* gene kodetzailearen eta *LOC107987281* gene ez-kodetzailearen adierazpena aztertu genuen 12 giza-ehunetan. Bigarren irudian ikus daitekeen moduan, bai lncRNA baita *TGM2* genearen adierazpen absolutuak oso baxuak ziren aztertutako ehun guztietan. Hala ere, bi geneen adierazpen-maila altuena, birika, plazenta eta bihotzean

detektatu zen. Spearmanen korrelazio-analisiak giza ehun hauetan *LOC107987281* eta *TGM2* geneen adierazpena korrelazionatuta dagoela erakutsi zuen (Spearmanen R= 0,87 (0,59-0,9); p<0,001).

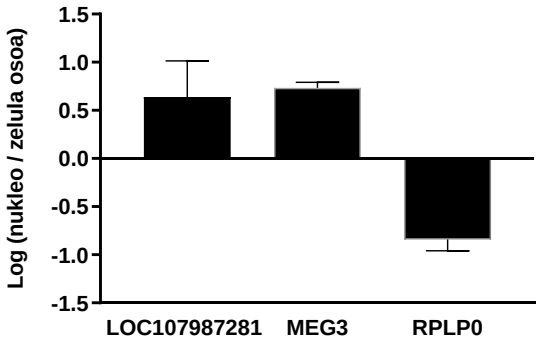
2. irudia. *LOC107987281* eta *TGM2* geneen adierazpenak 12 giza ehun desberdinetan. Zutabe beltzetan *LOC107987281* geneari dagozkien adierazpen–balioak ageri dira. Puntu gorriek, *TGM2* genearen adierazpen-balioak adierazten dituzte. Geneen adierazpena Q-PCRaren bitartez zehaztu zen, *HPRT* gene konstitutiboaren bitartez normalizatuz. Emaitzak hiru erreplika esperimentalen batezbestekoa ± SEM (batazbestekoaren errore estandarra) bezala adierazi dira.



3.3. LOC107987281 genearen ikerketa funtzionala EndoC-βH1 zeluletan

Lehenik eta behin, *LOC107987281* mRNAk pankreako beta zeluletan duen kokapena ikertu genuen, kokapenak lncRNAk eduki dezakeen funtzioaren inguruan informazioa ematen baitu. Horrela, nuklearrak diren lncRNAk transkripzioaren erregulazioarekin erlazionatuta egon daitezkeen bitartean, zitoplasman daudenak, RNAren egonkortasunean edo proteinen garraioan parte hartu dezakete. Pankreako beta zelulen frakzio nuklearra isolatu zen zelula-osoaren zatikiarekin konparatu ahal izateko. Bi frakzio hauetan lncRNAaren adierazpena aztertu zen, eta 3. irudian ikus daitekeen modura, *LOC107987281* lncRNAren kokapena nagusiki nuklearra zela ikusi zen.

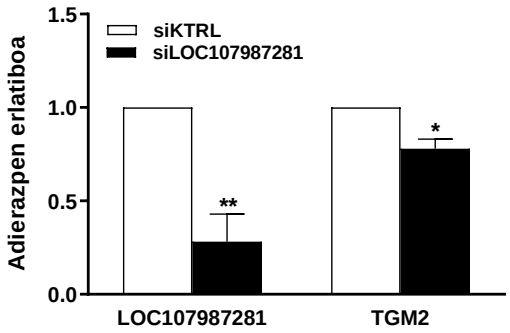
3. irudia. EndoC-βH1 zeluletan *LOC107987281* genearen kokapen zelularra. Q-PCRaren bitartez frakzio nuklearrean eta zelula erauzkin osoan, *LOC107987281*, *MEG3* (kontrol nuklearra) eta *RPLPO* (kontrol zitoplasmatikoa) aztertu ziren. Emaitzak (nukleo/zelula osoa) ratioaren logaritmo gisa adierazten dira. Emaitzak hiru esperimentu independenteen batezbestekoa ± SEM (batazbestekoaren errore estandarra) bezala adierazi dira.



3.4. Pankreako beta zeluletan LOC107987281 lncRNAk TGM2ren adierazpena kontrolatzen du

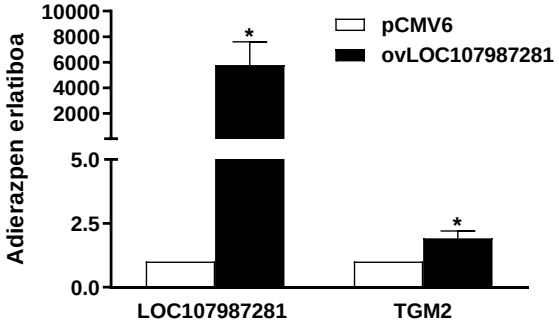
Hurrengo pausua, beta zeluletan *LOC107987281* isilarazpena egin eta *TGM2* genearen adierazpena neurtzea izan zen. Isilarazpena gauzatzeko siRNA molekula bat erabili genuen. siRNAk RNA molekula txikiak dira zeintzuk RNA itura lotu egiten diren, nukleotido osagarritasuna dela eta, RNA horren adierazpena blokeatuz. Kontrol gisa, giza genomako gene bakar batekin osagarritasuna ez duen siRNA molekula bat erabili genuen (siKTRL). *LOC107987281* isilaraztean, *TGM2* gene kodetzailearen adierazpenean murrizpen esangarria ikusi zen. siLOC107987281 siRNArekin isilarazpen eraginkorra lortu zen (%70ko isilarazpena); eta honen ondorioz, *TGM2* genearen adierazpena %23 inguru txikiagotu zen (4. irudia).

4. irudia. EndoC-βH1 zeluletan *LOC107987281* eta *TGM2* geneen adierazpen erlatiboak lncRNA itua isilarazterakoan. Isilarazpena gauzatzeko siLOC107987281 izendatu dugun siRNA molekula transfektatu zen**.** Geneen adierazpena Q-PCRaren bitartez zehaztu ziren, *HPRT* gene konstitutiboaren bitartez normalizatuz. Emaitzak hiru esperimentu independenteen batezbestekoa ± SEM (batazbestekoaren errore estandarra) bezala adierazi dira. *p < 0.05, **p <0.01 Student t-testaren arabera**.**



LOC107987281 isilarazpena aztertzeaz gain, honen gainadierazpena egitea erabaki zen. lncRNA gainadierazteko plasmidoa (ovLOC107987281) diseinatu eta ekoiztu zen pCMV6 deritzon adierazpen bektorea moldatuz. Kontrol modura pCMV6 plasmido hutsa erabili genuen. ovLOC107987281 plasmidoa erabilita lncRNA 5000 aldiz gainadieraztea lortu zen. *LOC107987281* gainadieraztean, *TGM2* genearen adierazpena bikoizten zela ikusi zen (5. irudia).

5. irudia. *LOC107987281* lncRNA gainadierazpenak EndoC-βH1 zeluletako TGM2 genearen adierazpenean duen eragina. Gainadierazpena ovLOC107987281 plasmidoaren transfekzioaren bidez lortu zen**.** Kontrol modura, pCMV6 plasmido hutsa erabili egin zen. Geneen adierazpena Q-PCRaren bitartez zehaztu zen, *HPRT* gene konstitutiboaren bitartez normalizatuz. Emaitzak hiru esperimentu independenteen batezbestekoa ± SEM (batazbestekoaren errore estandarra) bezala adierazi dira. *p< 0.05 Student t-testaren arabera**.**



4. Ondorioak

Oro har, *LOC107987281* izeneko RNA luze ez-kodetzaileak 2 motako diabetesaren garapenean eragina izan dezakeela iradokitzen dute gure emaitzek. Gure datuen arabera, lncRNA honen lehenengo exoian dagoen SNP bat, T2Daren patogenesiarekin bat datozen hainbat parametrorekin (intsulinaren jariapena, intsulinarekiko erresistentzia eta odoleko glukosa maila) asoziatuta dago. Asoziazio genetikoa T2D eta SNParen artean soilik emakumeetan detektatu dugu. T2Daren intzidentzia handiagoa da emakumeetan gizonetan baino, eta horren arrazoiak argi ez dauden arren, badirudi sexu-hormonek eragina izan dezaketela. Izan ere, zenbait baldintzetan estradiolek (emakumeetan dagoen sexu-hormona) pankreako beta zelulen funtzioan eragin negatiboa izan dezaketela ikusi da. Zentzu horretan, eta T2D gaixotasun konplexua dela kontuan izanik, SNParen eta emakumeen berezko ezaugarri biologikoen arteko interakzioak beta zelulen funtzioan eta gaixotasunaren garapenean eragin dezaketela pentsa daiteke. *LOC107987281* giza genoman *TGM2* gene kodetzailearekin gainjartzen da eta zenbait ikerketek ikusi dute TGM2 intsulinaren jariapenean parte hartzen duela. Ildo honetatik, zentzuzkoa da pentsatzea *LOC107987281*ek intsulinaren ekoizpen eta jariapenaren erregulazioarekin zerikusia duela.

Gure datuetan oinarriturik, lncRNA hau pankreako beta zelulen nukleoetan adierazten da, eta ondorioz, geneen transkripzioaren erregulazioan parte hartzen duela pentsa daiteke. Izatez, gure isilarazpen- eta gainadierazpen-esperimentuek *LOC107987281* lncRNAk *TGM2* genearen adierazpena kontrolatzen duela adierazten dute. Azterketa funtzional sakonagoak beharrezkoak dira lncRNA honen funtzio zehatza ezagutzeko eta pankreako beta zeluletan intsulinaren ekoizpen eta jariapenean duen eginkizuna azaltzeko.

5. Etorkizunerako planteatzen den norabidea

Ikerketa lan honen bitartez 2 motako diabetesarekin lotura eduki dezakeen lncRNA baten azterketa burutu dugu. *LOC107987281* RNA ez-kodetzaile hau *TGM2* gene kodetzailearen erregulazioan aritzen dela antzeman dugu, baina lncRNA honek TGM2ren adierazpena nola erregulatzen duen aztertzeke dago. *TGM2* geneak intsulinaren jariapenean zeresana badaukala kontuan hartuta, zentzuzkoa litzateke *LOC107987281* lncRNA intsulinaren ekoizpenean edota askapenean inplikaturik egotea. Horrela, etorkizunean lncRNA honen jarduera-mekanismoa aztertzeaz gain, intsulinaren ekoizpenean zein jariapenean duen inpaktua aztertuko dugu.

Bestalde, kontuan izanik *LOC107987281* honek T2Darekin asoziatuta dagoen polimorfismo bat duela, alelo bakoitzak T2Daren garapenean duen kontribuzioa zehazteko esperimentuak burutuko ditugu, lncRNAren adierazpen alelo-espezifikoa modulatuz.

6. Erreferentziak

Bernassola, F. et al. (2002), Role of transglutaminase 2 in glucose tolerance: knockout mice studies and a putative mutation in a MODY patient. *FASEB Journal*, 16, 1371-1378.

Bungay, P.J. et al. (1986), A role for transglutaminase in glucose-stimulated insulin release from the pancreatic β-cell. *The Biochemical Journal*, 235 (1), 269–278.

Chatterjee, S. et al. (2017). Type 2 diabetes. *Lancet*, 389 (10085), 2239–2251.

Eizirik, D.L. et al. (2009), The role of inflammation in insulitis and -cell loss in type 1 diabetes. *Nature Reiews Endocrinology*, 5, 219–226.

Minotti, L. et al. (2018), A long non-coding RNA inside the type 2 transglutaminase gene tightly correlates with the expression of its transcriptional variants. *Amino Acids* 50, 421–438.

Nurminskaya, M.V. et al. (2012) Cellular functions of tissue transglutaminase. *International Review of Cell and Molecular Biology*, 294, 1–97.

Porzio, O. et al. (2007), Missense mutations in the TGM2 gene encoding transglutaminase 2 are found in patients with early-onset type 2 diabetes. Mutation in brief no. 982. Online. *Human Mutation* 28 (11), 1150-1150.

Rauhavirta, T. et al. (2019) Transglutaminase 2 and Transglutaminase 2 Autoantibodies in Celiac Disease: a Review. *Clinical Reviews in Allergy and Immunology*, 57, 23–38.

Salter, N.W. et al. (2012). Functional characterization of naturally occurring transglutaminase 2 mutants implicated in early-onset type 2 diabetes. *Journal of molecular endocrinology*, *48*(3), 203–216.

Sileno, S. et al. (2014), A possible role of transglutaminase 2 in the nucleus of INS-1E and of cells of human pancreatic islets. *Journal of Proteomics*, 96(100), 314-327.

7. Eskerrak eta oharrak

Ikerketa proiektu hau Diabetesaren Ikerketarako Fundazio Europarrak (EFSD/JDRF/Lilly Programme on Type 1 Diabetes Research) eta Espainiako Gobernuko Zientzia, Berrikuntza eta Unibertsitate Ministerioak (PID2019- 104475GA-I00 eta PGC2018-097573-A-I00) finantzatu dute.

Litioaren toxikotasuna muskuiluetan

Fraga, N.[1,2]; Izagirre, U.[1,2] eta Ruiz, P.[2]

[1]*Itsas Biologia eta Bioteknologia Esperimentalen Ikerketa Zentroa; Plentziako Itsas Estazioa, PiE-UPV/EHU.*

[2]*Zoologia eta Animalia Zelulen Biologia Saila, Zientzia eta Teknologia Fakultatea, UPV/EHU*

nadezhnafraga@gmail.com

Laburpena

Prozesu eta gailu industrial askotan litioaren erabileraren hedatzeak ingurumenean eragin lezake hurrengo urteetan. Hala ere, informazio gutxi dago litioak itsas organismoetan duen toxikotasunari buruz. Beraz, ikerketa honen helburua litioaren toxikotasuna eta alterazio histologikoak zehaztea da, *Mytilus galloprovincialis* muskuilua ekosistemaren osasuna ebaluatzeko behatzaile gisa erabiliz. Horretarako, toxikotasun akutuko testa eta test subletala burutu ziren. Emaitzek erakutsi zuten LC50-ren balioa ingurumenean aurkitutako kontzentrazioak baino handiagoa zela, baina, era berean, litioak alterazio histopatologikoak eragin ditzakeela kontzentrazio txikiagoetan. Ikerketa honen aurkikuntzek ikuspegi berriak irekitzen dituzte litioak itsas organismoetan dituen ondorio toxikoak ulertzeko.

Hitz gakoak: Litioa, *Mytilus galloprovincialis*, toxikotasuna, kontzentrazio hilgarria

Abstract

The increased use of lithium in lots of industrial processes and devices could produce an environmental impact on aquatic environment in coming ages. However, there is only scarce information concerning the toxicity of lithium in marine organisms. Therefore, the aim of this research is to determine the toxicity and histological alterations of lithium, using the mussel Mytilus galloprovincialis as a model organism for ecosystem health assessment. For this purpose, an acute and a sublethal toxicity tests were headed. Results showed that the LC50 value was higher than concentrations found in ambient waters, but also showed that lithium induces histopathological alterations in lower concentrations. The findings of this research open new perspectives for the understanding of the toxic effects of lithium on marine organisms.

Keywords: Lithium, Mytilus galloprovincialis, toxicity, lethal concentration

1. Sarrera eta motibazioa

Garraiobide berriek (ibilgailu elektrikoek, bizikleta elektrikoek, dronek…), konektibitate-aplikazioek (*smartphone*, tabletek, *laptop*-ek, etxe-tresna elektriko txikiek…) eta energia biltegiratzeko sistema berriek baterien erabilera handitzea dakarte (Comission 2006/66/EC). Beraz, azken hamarkadan litio-ioizko bateriak biltegiratze-teknologia nagusiena bilakatu dira. Litioak (Li) energia kimikoa energia elektriko bihurtzen du oso modu eraginkorrean, kostuak murriztuz eta fabrikazio-ahalmenak handituz (IEA, 2017). Modu honetan, litio-eskaera izugarri handitu da, eta elementu hori lortzeak ingurumenean inpaktu nabarmena izan dezake. Era berean, nahiz eta litiozko baterien erabilera asko emendatu den, haien birziklatze-tasa momentuz oso txikia da (Comission 2006/66/EC; Swarnakar & Choubey, 2014; Zeng et al., 2014). Kasu gehienetan, "beste bateria" gisa sailkatzen dira, gainera Europako Parlamentuak ez ditu bilketa-helburu sendoak edo betebeharrak ezartzen litio-baterien barruan dauden produktu kimikoen berreskuratzea sustatzeko, eta beraz udal-hondakin solidoak dituzten zabortegietan amaitzen dira (Comission 2006/66/EC; Zeng et al., 2014).

Zoritxarrez, bateria horietako elementu kimikoek (Co, Ni, …) efektu ugari eragin ditzakete ingurumenean eta gizakian (Moore, 1995; Aral & Vecchio-Sadus, 2008; 2011). Hala ere, ez daude hain argi litioak ingurumenean eta ondorioz gizakietan sor ditzakeen efektuak. Izan ere, litio-aluminiozko hidruroak eta litio metanolatoa Danimarkako substantzia arriskutsuen zerrendan aurki daitezke (Kjølholt et al., 2003) baina, egin diren ikerketa urriak kezkak sortzen dituzte (Lebedeva & Brett, 2016). Beraz, metal horrek hainbat organismotan sortzen duen toxikotasuna ebaluatzea oso garrantzitsua da, esposizio dosi eta denbora tarte desberdinak kontuan hartuz.

Biogeokimikoki, litioa oso elementu mugikorra da. Horren ondorioz, distantzia luzeak egin ditzake, ur-inguru desberdinen litio-maila handituz. Gainera, ingurumen-inpaktua areagotu egin daiteke meatzeen aktibitateak jasaten duten lekuetan. Litio pururik ez dago naturan, fosfato, silikato edo mika bezalako gatzetan agertu ohi da (Aral & Vecchio-Sadus, 2008; 2011). Gatz horietako litioa, erosioaren ondorioz, lurzoruetara iristen da, eta han landareek xurgatzen dute (Lenntech, 2007). Landareek elika-katean maila garrantzitsua direnez, animaliak eta gizakiak ere litioaren eraginpean egon daitezke horietaz elikatuz gero (Kabata-Pendias & Mukerjee, 2007).

Lurzoruetako litioaren balio ertainak 3 - 350 mg/kg bitartekoak dira (Aral & Vecchio-Sadus, 2008). Ingurune urtarretan ere badago, batez ere forma ionikoan. Bibliografiaren arabera, ur gezatan Li-ren kontzentrazioa 0,001 - 0,01 mg/L artekoa da, eta itsasoko uretan 0,17 - 0,19 mg/L artekoa (Reimann & Caritat, 2012). Lurpeko uraren kontzentrazioa, berriz, 0,5 mg/L izan da (Aral & Vecchio-Sadus, 2008). Hala ere, orain arte informazio gutxi dago itsas inguruneko litioaren kontzentrazioari buruz, eta are gutxiago horrek eragin litekeen efektuei buruz.

Alde batetik, litioaren erabilera industrialak ingurumena kutsatzen laguntzen du (Aral & Vecchio-Sadus, 2008; 2011). Baterietan erabiltzen den litioa meatzaritza-prozesuen bidez lortzen da. Jarduera horiek lotura estua dute ingurumenaren inpaktu negatiboekin, lekuaren eta aplikatutako teknologiaren arabera. Izan ere, litioaren erauzketaren ondorioz, errekak substantzia arriskutsuekin kutsatzen dira (Comission 2006/66/EC), eta substantzia hauek organismoetan eragin dezakete.

Bestalde, litioa bizitzarako funtsezko elementua ez den arren eta erabilera biologiko ezagunik ez duen arren (Lenntech, 2007), ezaugarri interesgarriak ditu (Nielsen, 1988). Hau dela eta, terapeutikoki erabiltzen da gaixotasun psikiatrikoak tratatzeko, hala nola depresio maniakoa (bipolaritatea) eta bestelako gaitz afektiboak (Moore, 1995). Nerbio-sistema zentrala da itu-organo nagusia, baina metabolismoan eta zelulen proliferazioan ere eragiten du gizakietan, baita beste organismo askotan ere (Kjølholt et al., 2003; Aral & Vecchio-Sadus, 2008). Gaur egun, litioa gaixotasun horiek tratatzeko erabiltzen da baina toxikotasunaren eta dosifikazio eraginkorraren arteko leiho terapeutikoa oso estua da. Malgor-ek (2016) efektu terapeutikorik onenak odolean 0.7 – 1.4 mg/L bitarteko litio kontzentrazioak lortzen direnean ematen direla azaltzen du. Aldiz, toxikotasunaren ondorioak erraz garatzen dira litemiaren balioak 2.0 mg/L-koak direnean, hilkortasuna 2.5 mg/L-ko balioa gainditzen denean eman daitekeelarik.

Laburbilduz, litioaren erabilera handitu egin dela nabaria da, eta metal honi buruzko kezkak areagotuz doaz denbora pasa ahala. Erabilera horrek eragin nabarmena izan dezake ingurumenean eta, beraz, organismo bizidunen osasunean eta ongizatean. Argi dago, beraz, zer garrantzia duen metal horren toxikotasunari buruzko ikerketak, kutsatzaile emergentetzat hartzen baita (Comission 2006/66/EC; Aral & Vecchio-Sadus, 2008; 2011).

2. Arloko egoera eta ikerketaren helburuak

Goi-teknologiako produkzioan erabiltzen diren elementu emergenteen toxikotasunaren inguruan dagoen ezagutza oso baxua da. Lehorreko ekosistemetan, litioak gizakiengan eta beste organismo batzuengan eragin handia izan ahal duela jakinarazi da (Moore et al., 1995; Aral & Vecchio-Sadus, 2008; Aral & Vecchio-Sadus, 2011). Adibidez, arratoiek errinitis ultzeratiboa, metaplasia ezkatatsua, laringitis nekrosikoa eta arnas zailtasunak garatzen dituzte %80 litio karbonatoa duten aerosolekiko esposizioa jasatean. Anorexia eta deshidratazio adierazgarriak ere antzeman dira, litioarekin tratatutako pertsonetan (Greenspan et al., 1986).

Aitzitik, orain arte, litioaren erabilera handitzeak ez du ikerketa askorik eragin ekosistema urtarrean litioaren efektuak aztertzeko. Izan ere, ez dago emaitza ugari eta argirik litio-kontzentrazioari buruz ekosistema horietan, eta horrek zaildu egiten du toxikotasuna ebaluatzea. Zenbait ikerketetan litioaren toxikotasun probak egin dituzte eta kontzentrazio hilgarriak ur ekosistemetan gaur egun aurki daitezken kontzentrazioak baino askoz handiagoak izan dira (Lenntech, 2007; US EPA, 2008). *Daphnia magna* organismoarentzako efektu kontzentrazioa (EC50) 33 – 197 mg / L-koa zela zehaztu da, eta 185 – 232 mg / L-ko kontzentrazio hilkorra (LC50) mugatu da *Dreissena polymorpha* ur-gezako muskuiluarentzako (US EPA, 2008). Vallek (2019), berriz, 324 mg / L-ko LC50 identifikatu du *Littorina littorea*-rako.

Litio bezalako kutsatzaileek organismo urtarretan duten eragina aztertzeko, ekotoxikologia funtsezko tresna bihurtu da. Aldi berean, toxikotasun-probek ekosistema urtarraren babesa sortzen laguntzen dute. Toxikotasun akutuko testak erabiltzen dira litioak organismo urtar desberdinetan duen eragina zehazteko (US EPA, 2008; Valle, 2019); izan ere, erantzun akutuek bibalbioek duten kutsatzaileekiko sentikortasun-atariei buruzko informazioa ematen dute. Honen bidez, kontzentrazio hilkorra (LC50) eta erantzun hilgarriaren denbora (LT50) bezalako parametroak kalkulatu daitezke (Crane et al., 1995).

Ikusi bezala, zenbait datuk adierazten dute Li kontzentrazio handiek ondorio ugari eragin ahal dituztela organismoetan. Aldiz, toxikotasun subletalaren efektuei buruzko datu gutxi daude. Izan ere, Li bezalako ingurumen-kutsatzaileek, kontzentrazio handietan muskuiluetan ondorio larriak eragiteaz gain, efektu subletalak ere eragin ditzakete kontzentrazio baxuetan, ingurumenean aurkitu ditzakegun bezalakoetan. Hortaz, toxikotasun akutuaren atari-mailatik beherako kontzentrazioak ere interesgarriak dira efektu subletalen ikerketarako eta epe luzerako efektuak aztertzeko. Beraz, ondorioak eta estresa antolamendu biologikoaren maila desberdinetan aztertu behar dira (organoak eta azpi-organoak), erantzun biologikoak sortu ahal duten kontzentrazioak ezarriz. Toxikotasun subletalaren probek metalen eta itu-molekularren eta zelularren arteko elkarreraginak ulertzen laguntzen dute; interakzio horiek aldaketa histokimiko, histologiko eta biometrikoetan ikusi daitezkeelarik.

Kutsadurak eta ingurumeneko beste faktore estresagarri batzuek muskuiluetan erantzun metabolikoa eragiten dute, eta horrek ehun, zelula eta molekula mailako berrantolaketak eragiten ditu. Biomarkatzaileak erabiltzen dira kutsatzaile desberdinen eragina ebaluatzeko, hala nola lisosomen tamaina, morfologia eta egonkortasuna; edo liseri epitelioaren osaeraren aldaketa eta integritatearen galera bezalako alterazio histopatologikoak (Marigomez & Baybay-Villacorta, 2003; Izagirre et al., 2009; Izagirre & Marigomez, 2009).

Gaur egun, muskuiluetan lisosomen hiru erantzun nagusi daude ingurumen-estresaren aurrean: lisosoma-mintzaren ezegonkortasuna murriztea, lisosomen bolumen handipena eta lisosomen edukiaren aldaketak, hala nola lipofusina edo lipido neutroen metaketa (Marigomez & Bay- Villacorta, 2003; Davie & Vethaak, 2012; Blanco, 2018). Bestalde, zenbait organo eta ehunetako alterazio histopatologikoak azter daitezke batez ere brankiak, digestio-guruinak eta gonadetan, hauek ehun-mailako biomarkatzaileak baitira. Aldaketa horiek asaldurak adierazten dituzte antolamendu biologikoaren hainbat mailatan, eta adierazle sentikorrak eta fidagarriak dira espezie urtarren osasun egoera orokorraren ebaluazioa burutzeko.

Kutsaduraren jarraipenerako programetan eta esperimentu toxikologikoetan, muskuiluak behatzaile gisa erabiltzen dira, daukaten ezaugarri biologiko/ekologikoengatik (Goldberg, 1975; Davies & Vethaak, 2012; Beyer et al., 2017). Animalia sesilak dira, iragaziz elikatzen direnak, jarduera metaboliko txikia dute eta ingurumeneko kutsaduraren adierazgarri dira. Ingurumenaren estresarekiko tolerantzia erlatiboa dute eta kutsatzaile ugari metatzeko ahalmen handia ere (Goldberg, 1975). Gainera, laborategian erlatiboki erraz mantentzen direnez, oso erabiliak dira esperimentazioan. Beraz, litioarekiko esposizioaren efektuak *Mytilus galloprovincialis* organismoan aztertuko dira ekosistema itsastarreko eredu gisa.

Hau jakinda, litioak muskuiluetan efektu toxikoa izan dezake eta efektu-kontzentrazioak zehatzago definitu behar dira ekosistemetan izan ditzaketen eragina ebaluatzeko. Horrela, hauek dira planteatzen diren helburuak:

- Litio (Li) kontzentrazio hilgarria zehaztea *Mytilus galloprovincialis* muskuiluarentzako.
- *Mytilus galloprovincialis* muskuiluaren litioarekiko esposizioak ekar ditzakeen efektu subletlak aztertzea bere arriskua zehazteko.

3. Ikerketaren muina

3.1. Organismoa

Toxikotasun-probetan, 2,5 – 3,5 cm-ko luzerako muskuiluak erabili ziren. Itsasbeheraren marka-maila baxuan jaso ziren Plentzian (Euskal Kostaldea; 43º24'N, 2º55'W) 2019ko urrian.

Muskuilu laborategira eraman ziren, eta 20 L-ko polietilenozko ontzietan eduki ziren. 14 egunez aklimatatu ziren etengabeko itsasoko ur fluxuarekin, eta hiru egunez behin elikatu ziren. Aklimatazioaren ondoren, animaliak esposizio-esperimentuetarako erabili ziren.

Aklimatazio eta esperimentazioan zehar hauek izan ziren mantendu zireneko laborategi baldintzak: uraren tenperatura, 18-19 °C; pH, 7,8; eroankortasuna: 48.000-51.000 Ω eta gazitasuna, 33 PSU. Esperimentuetan erabilitako janari komertziala *Isochrysis spp., Tetraselmis spp., Pavlova spp., Pavlova spp., Nannoche loropsis spp.* eta *Spirulina spp*. algen nahasketa (1:10; 3,5 mL; Acuinuga, Coruña, Espainia) izan zen.

3.2. Diseinu esperimentala

Litioa LiCl gisa aplikatu zen (>99, ACROS, USA) bi esperimentuetan. *Stock* soluzio bat prestatu zen (5 g Li / L), 31,25 g LiCl 0,2 µm-tara iragazitako itsasoko ur litro batean diluituz.

Fibonacci-ren eskala erabili zen esperimentu akutuan konposatu kimiko honen 8 esposizio-kontzentrazioak hautatzeko. *Littorina littorea*-ren toxikotasun akutuko proban (Valle, 2019) hautatutako esposizio-kontzentrazioak kontuan harturik, hautatu ziren esposizio-kontzentrazioak: 0 (kontrola), 2, 5, 13, 34, 89, 233, 610 mg/L Li. Beraz, 8 talde esperimental ezarri ziren, talde bakoitzeko 3 erreplika ezarriz. Erreplika bakoitzean 5 muskuilu 0,5 L-ko polietilenozko ontzietan eduki ziren, aireztapen etengabean, 9 egunez. Uraren aldaketa 2 egunero egin zen amonio/amonia kontzentrazioa 0,5 mg/L-tik behera izateko.

Hilkortasuna zehazteko talde esperimentalak egunero aztertu ziren. Muskuiluak hiltzat jo ziren balbak irekita edo partzialki irekita zeudenean eta manipulazioari erantzuten ez zutenean. Hildako espezimenen kopurua egunero ontzietatik kendu eta anotatu zen. Heriotza-tasari buruzko datuak erabili ziren kontzentrazio hilgarriaren batezbestekoa (LC50) eta erantzun hilgarriaren denbora (LT50) kalkulatzeko.

Esperimentu akutuko emaitzak kontuan izanik, histopatologia eta histokimika aztertzeko nahian, epe motzeko esperimentu subletala burutu zen muskuiluak hurrengo Li kontzentrazioetan mantenduz 7 egunetan zehar: kontrola, 1 mg/L (baxua), 50 mg/L (moderatua), 100 mg/L (altua). Kontzentrazio bakoitzerako 50 muskuilu 10 L-ko polietilenozko ontzietan eduki ziren, aireztapen etengabean. Uraren aldaketa 2 egunero egin zen.

Histopatologia eta histokimikarako laginak hartu ziren esperimentuaren hasieran (T0) eta 7 egun pasa eta gero (T7), bien arteko konparazioa burutu ahal izateko. T0 taldeko muskuiluek ez zuten Li-rekiko esposiziorik jasan, horrek esperimentuaren kontrol orokorra izateko gaitasuna ematen baitu. Analisi histopatologikorako, parafinan sartutako 10 indibiduoen zeharkako ebakiak burutu ziren organo guztien behaketa egiteko. Analisi histokimiko eta biokimikorako beste 10 indibiduoen oinak, brankiak eta liseri-guruinak biltegiratu ziren -80ºC hozkailuetan nitrogeno likidoz izoztu ondoren. Histopatologiarako laginak hematoxilina-eosinaz tindatu ziren mikrotomoarekin parafinazko 0,5 µm-ko ebaketak egin ondoren. Azkenik, argi-mikroskopioan aldaketa histologikoak identifikatu ziren (2. Irudia).

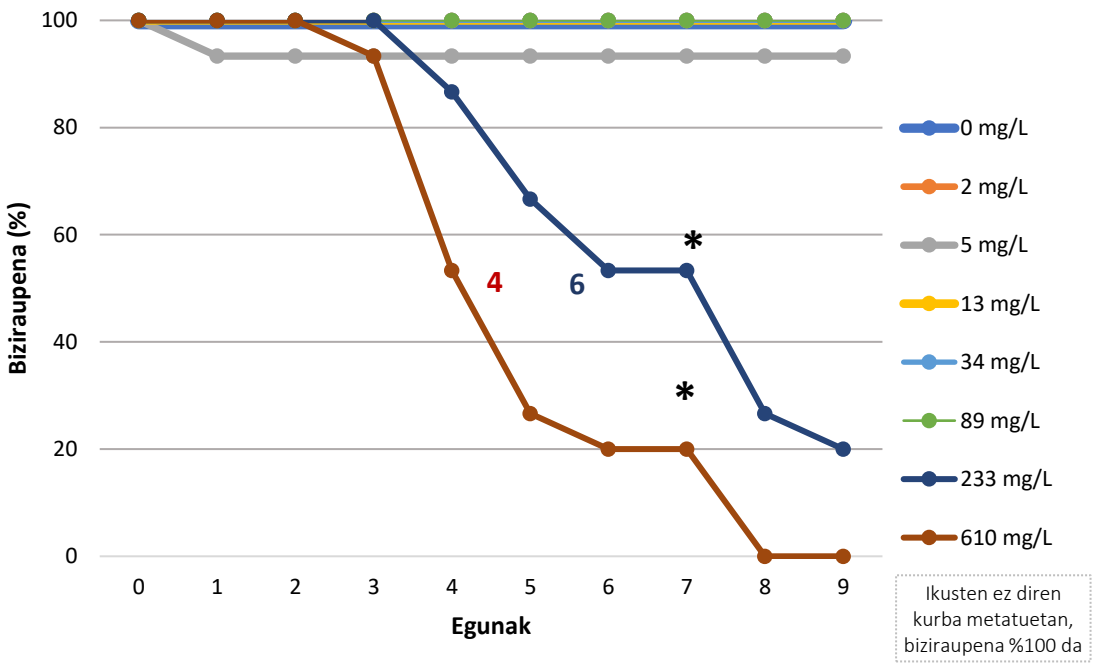
3.3. Estatistika

Analisi estatistikoak IBM SPSS 25.0 erabiliz egin ziren. LC10 eta LC50 zehazteko, Probit analisia erabili zen dagozkien denbora-tarteetan. Kaplan-Meier proba ez-parametrikoaren bidez biziraupen-kurben arteko aldeak aztertu ziren. % 95eko adierazgarritasun-maila ($p = 0,05$) ezarri zen.

3.4. Emaitzak

Egindako toxikotasun akutuko probaren bidez lortutako hilkortasun-datuak Li-ak *M. galloprovincialis*-rengan duen toxikotasun akutua ebaluatzeko erabili ziren. Datu horiek talde esperimentalen biziraupen metatuko kurbak eraikitzeko erabili ziren (1. irudia). Esperimentuan zehar ez zen hilkortasun nabarmenik neurtu kontrolean eta kontzentrazio baxuenetan. Bakarrik muskuilu bat hil zen 5mg/L kontzentrazioan, hilkortasuna 10% baino baxuagoa izan zelarik. Biziraupena nabarmenki gutxitu zen ($p < 0,05$) bi kontzentrazio altuenetan (233 mg/L eta 610 mg/L) kontrolarekin konparatuz. Hilkortasuna %80-ra heldu zen 9 egun eta gero, 233 mg/L Li-pean egondako muskuiluetan. Kontzentrazio altuenean (610 mg/L), berriz, azken egunerako muskuilu guztiak hilda zeuden. Hilkortasuna 100%-ekoa izan zen 8. egunean. Biziraupen-denbora luzeenak 233 mg/L baino kontzentrazio txikiagoetan erregistratu ziren (0, 2, 5, 13, 34, 89 mg/L). Li-ren kontzentrazio altuenaren eraginpean zeuden muskuiluetan LT50 txikiagoa izan zen, 4 egun, eta 233 mg/L Li-ren eraginpean zeuden muskuiluetan, aldiz, 6 egun.

Toxikotasun akutuaren proban lortutako hilkortasun-datuak kontzentrazio hilgarriaren balioak zehazteko erabili ziren (LC10 eta LC50) (1. taula). 9 eguneko 153.9 mg/L Li-ko LC50 balioa lortu zen *M. galloprovincialis* muskuilurako. Bestalde, LC10a, populazioaren %10a hiltzeko behar den kontzentrazioa adierazten duen datua, 15.1 mg/L da eta LC90, populazioaren %90 hiltzeko behar den kontzentrazioa adierazten duen datua, 551.6 mg/L-koa da.

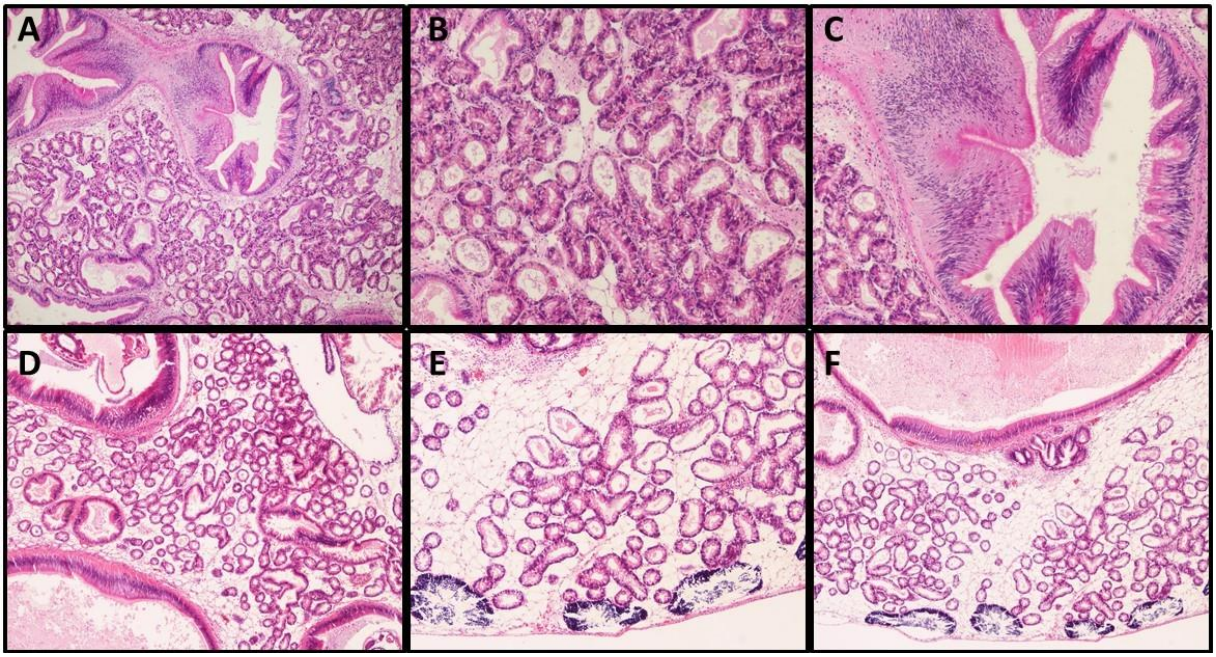


1. irudia. Li kontzentrazio desberdinpean egondako muskuiluen (*M. galloprovincialis*) biziraupen kurba metatuak (0-610 ppm). Izartxoek diferentzia nabarmenak adierazten dituzte kutsatzaileen kontzentrazio desberdinen eraginpean dauden muskuiluen artean. Zenbakiek talde esperimental bakoitzeko LT50 adierazten dute.

1. taula. Kontzentrazio hilgarriaren (mg/L) balioak (LC10, LC50 eta LC90) Li-ren eraginpean dauden muskuiluentzat.

DENBORA(EGUNAK)	LC10 (mg/L)	LC50 (mg/L)	LC90 (mg/L)
4	9.4	1665.4	228808.5
5	11.9	430.9	15569.3
6	12.2	310.6	1849.4
7	12.2	310.6	1849.4
8	15.2	165.2	615.4
9	15.1	153.8	551.5

Esperimentu subletalari dagokionez, analisi histopatologikoa burutu egin zen argi-mikroskopioa erabiliz (2. Irudia). Antzeman zitezkeen aldaketen artean, liseri-epitelioaren altueraren murrizketa dago. Kontrolean epitelioaren lodiera handia da, kontzentrazio altuko indibiduoaren epitelioarekin konparatuz. Gainera, liseri-albeoloen epitelioaren altueraren murrizketa ere antzeman daiteke. Bestalde, liseri-albeoloen arteko ehun konektiboaren kantitatearen emendaketa ematen da kontzentrazio altuko muskuiluetan, liseri-albeoloen degradazioa eman delako seinale.



2. irudia. *M. galloprovincialis* muskuiluaren liseri guruinaren mikrografia 7. egunean (T7), hematoxilina-eosinaz tindatuz. A, B eta C: kontrol indibiduoaren liseri guruina. D, E eta F kontzentrazio altuko (100 mg/L Li) indibiduoaren liseri guruina.

4. Ondorioak

M. galloprovincialis muskuiluarentzako LC50 153.8 mg/L Li-koa izan zela ikusi zen, 9 eguneko esposizioaren ondoren. Lortutako LC50 *Dreissena polymorpha* eta *Litorina littorearentzat* emandakoak (185 – 232 mg/L, US EPA, 2008; 324 mg/L, Valle, 2019) baino txikiagoa izan arren, itsasoko uretan dauden litio-kontzentrazioak baino handiagoa izaten jarraitzen du (0,17 – 0,19 mg/L; Reimann & Caritat, 2012). Hala ere, Li-ren eragin kimikoa ez da gutxietsi behar, sortzen dituen efektu histopatologikoak kontuan hartu behar baitira. Hortaz, kutsatzaile emergentetzat hartzen denez, oso garrantzitsua da metal honen azterketa sakona egitea, etorkizunean sor dezakeen ingurumen-inpaktua txikiagotzeko.

5. Etorkizunerako planteatzen den norabidea

Alde batetik, aurreko emaitza histopatologikoen analisi kuantitatiboak egingo lirateke, parametro desberdinak zehaztasunez alderatu eta aztertu ahal izateko. Horretaz gain, analisi histokimikoak burutuko lirateke. Haien artean lipofuszinen kontzentrazioaren emendaketa, lipido neutroen metaketa, lisosomen mintzaren egonkortasuna eta hauen aldaketa morfologikoa. Azkenik, analisi biokimikoak burutzea ondo legoke. Honela, biomarkatzaile guztien integrazioz, metal honen eraginaren ondorio zehatzak eta argiak ateratzea lor daitekeelako.

Bestetik, litioaren eskaera handitu ahala, gailu elektronikoak eta ibilgailu elektrikoak sortzeko nahia ere handitu egingo da, eta metal hau birziklatzeko helbururik sartu ezean, haren inpaktua ingurumenean gero eta bortitzagoa izango da. Hori dela eta, etorkizuneko ikerketaren ikuspegitik, Li sakon aztertu behar da haren efektu biologikoak ulertzeko. Hortaz, interesgarria izango litzateke ekotoxikologiari eta ingurumenari dagokionez egokiak diren kontzentrazioak erabiltzea, muskuiluetan zer nolako efektuak sortzen dituzten deskribatu ahal izateko.

Horretarako, LC10 balioak kontuan hartu beharko genituzke. Kontzentrazio altuena 15 mg/L Li baino baxuagoa izan beharko litzateke. Izan ere, kontzentrazio horretan, populazioaren %10 hilko litzateke eta kontzentrazio hori baino baxuagoak kontzentrazio subletaltzat hartuko lirateke. Hori horrela, lau Li kontzentrazio desberdin erabili ahal zitezkeen: kontrola, 0.1 mg/L (baxua), 1 mg/L (moderatua), 10 mg/L (altua). Kontzentrazio baxu gisa Reimann eta Caritat-ek (2012) ur gazian aurki daitezken Li kontzentrazioa hartuko litzateke (0.17-0.19 mg/L Li). Kontzentrazio moderatua eta altua aldiz, litio metalaren erauzketa guneetan aurki daitezkeen kontzentrazioak izango lirateke, zonalde hauetan sor daitezkeen efektuak aztertzen lagunduz (Aral & Vecchio-Sadus, 2008; 2011).

6. Erreferentziak

Aral, H., & Vecchio-Sadus, A. (2008). Toxicity of lithium to humans and the environment—a literature review. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *70*(3), 349-356.

Aral, H., & Vecchio-Sadus, A. (2011). Lithium: Environmental Pollution and Health Effects. *Encyclopedia of Environmental Health*, 499-508.

Beyer, J., Green, N. W., Brooks, S., Allan, I. J., Ruus, A., Gomes, T., ... & Schøyen, M. (2017). Blue mussels (*Mytilus edulis spp*.) as sentinel organisms in coastal pollution monitoring: a review. *Marine environmental research*, *130*, 338-365.

Blanco, E. (2018). *Contribution to the development of Best Available Practices (BAPs) for a multi-biomarker approach in sentinel mussels based on a better understanding of the influence of confounding factors on biomarker values and responsiveness.* (International PhD Thesis). Plentziako Itsas Estazioa (PiE – UPV / EHU), Bizkaia.

Comission Staff Working Document on the evaluation of the Directive 2006/66/EC on batteries and accumulators and waste batteries and accumulators and repealing Directive 91/157/EEC.

Crane, M., Delaney, P., Mainstone, C., & Clarke, S. (1995). Measurement by in situ bioassay of water quality in an agricultural catchment. *Water Research*, *29*(11), 2441-2448.

Davies, I. M., & Vethaak, A. D. (2012). Integrated Marine Environmental Monitoring of Chemicals and Their Effects. *ICES Cooperative Research Report*, 315. ICES: Copenhagen. 277 pp.

Dent, S. F., & Eisenhauer, E. A. (1996). Phase I trial design: are new methodologies being put into practice. *Annals of Oncology*, *7*(6), 561-566.

Goldberg, E. D. (1975). The mussel watch-a first step in global marine monitoring. *Mar. Pollut. Bull. 6*, 111.

Greenspan, B. J., Allen, M. D., Rebar, A. H., & Boecker, B. B. (1986). Inhalation toxicity of lithium combustion aerosols in rats. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A Current Issues*, *18*(4), 627-637.

International Energy Agency (IEA). (2017). Tracking clean energy progress 2017.

Izagirre, U., & Marigómez, I. (2009). Lysosomal enlargement and lysosomal membrane destabilisation in mussel digestive cells measured by an integrative index. *Environmental pollution*, *157*(5), 1544-1553.

Izagirre, U., Ruiz, P., & Marigómez, I. (2009). Time-course study of the early lysosomal responses to pollutants in mussel digestive cells using acid phosphatase as lysosomal marker enzyme. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, *149*(4), 587-597.

Kabata-Pendias, A., & Mukherjee, A. B. (2007). *Trace elements from soil to human*. Berlin: Springer Science & Business Media.

Kjølholt, J., Stuer-Lauridsen, F., Skibsted Mogensen, A., Havelund, S. (2003). The Elements in the Second Rank—Lithium. Miljoministeriet, Copenhagen, Denmark. Retrieved from https://www.miljoeogressourcer.dk/filer/lix/2457/87-7972-492-2 Milj projekt nr. 770 2003 .pdf.

Lebedeva, N. P., & Boon-Brett, L. (2016). Considerations on the chemical toxicity of contemporary Li-ion battery electrolytes and their components. *Journal of The Electrochemical Society*, *163*(6), A821.

Lenntech. (2007). Lithium and water: reaction mechanisms, environmental impact and health effects. Retrieved from https://www.lenntech.com/periodic/water/lithium/lithium-and-water.htm.

Malgor, V. (2016). Farmacología De Las Sales De Litio. *Farmacología General y Del Sistema Nervioso Autónomo* (pp. 153-161).

Marigómez, I., & Baybay-Villacorta, L. (2003). Pollutant-specific and general lysosomal responses in digestive cells of mussels exposed to model organic chemicals. *Aquatic Toxicology, 64*(3), 235-257.

Marigómez, I., Ireland, M. P., & Angulo, E. (1990). Correlation of cadmium shell-weight index with environmental stress indicators at the cellular and organismic levels in *Littorina littorea*. *Marine Ecology Progress Series*, 171-176.

Marigómez, J. A., & Ireland, M. P. (1990). A laboratory study of cadmium exposure in *Littorina littorea* in relation to environmental cadmium and exposure time. *Science of the total environment, 90*, 75-87.

Moore, J. A. (1995). An assessment of lithium using the IEHR evaluative process for assessing human developmental and reproductive toxicity of agents. *Reproductive Toxicology, 9*(2), 175–210.

Nielsen, F.H. (1988). Ultra-trace minerals. In Shils, M.E., Olson, J.A., Shike, M. & Ross, A.C. (Eds.), *Modern Nutrition in Health and Disease* (pp. 278–291). Philadelphia: Lea and Febiger.

Penel, N., & Kramar, A. (2012). What does a modified-Fibonacci dose-escalation actually correspond to?. *BMC medical research methodology, 12*(1), 103.

Reimann, C., & De Caritat, P. (2012). *Chemical elements in the environment: factsheets for the geochemist and environmental scientist*. Berlin: Springer Science & Business Media.

Soto, M., Ireland, M. P., & Marigómez, I. (2000). Changes in mussel biometry on exposure to metals: implications in estimation of metal bioavailability in 'Mussel-Watch' programmes. *Science of the total environment, 247*(2-3), 175-187.

Swarnakar, Arvind & Choubey, Dr.Shweta. (2014). Hazardous chemical present in Batteries and their impact on Environment and Humans. Retrieved from https://www.researchgate.net/publication/274636169.

US EPA. (2008). ECOTOX retrieval database.

Valle, A. (2019). *Evaluación de la toxicidad de contaminantes metálicos emergentes (Tl y Li) mediante bioensayos de adherencia en bígaros.* (Master Thesis). Plentziako Itsas Estazioa (PiE – UPV / EHU), Bizkaia.

Zeng, X., Li, J., & Singh, N. (2014). Recycling of spent lithium-ion battery: a critical review. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology, 44*(10), 1129-1165.

7. Esker onak

Eskerrik asko Tifanie Briaudeauri ikerketa proiektu honekin lagundu eta hainbeste irakatsi izanagatik. Eta aldi berean, eskerrik asko Denis Benitori, egun askotan zehar laborategian nirekin egon izanagatik eta ikerketa-mundua zer den erakusteagatik.

Foto-polimerizazio bidezko itsasgarrien gogortzea

Almandoz Garmendia, N., Sardon Muguruza, H.
Material polimerikoen kimika, POLYMAT
nora.almandoz@polymat.eu

Laburpena

Hainbat itsasgarri-nahaste argiaren bidez gogortu daitezke segundo edo minutu gutxitan. Nahaste hauek monomeroa bera eta sistema aktibatzaile bat dituzte osagaitzat; sistema aktibatzaile horiek argi azpian jartzean, monomeroaren polimerizazioa (edo gogortzea) abiarazteko gai dira. Gogortze mota honi foto-polimerizazio deritzo (argi bidezko polimerizazioa, hitzak dioen bezala), eta normalean argi ultramorea (UM) erabiliz eramaten da aurrera. Irradiazio ultramorea, jakina denez, kaltegarria da; hori dela eta, gero eta ikerkuntza gehiago burutzen ari dira kalte txikiagoa eragiten duten irradiazio iturrien erabileran oinarrituta; hots, energia txikiagoko argietan oinarrituta. Proiektu honen helburua argi ez-kaltegarria erabiliz itsasgarrien gogortzea eragin dezaketen sistema aktibatzaileak aurkitzea da.

Hitz gakoak: Itsasgarriak, Foto-polimerizazioa, Gogortzea, Infragorria

Abstract

Light curable adhesives are mixtures which cure in seconds or minutes when exposed to light. The mixtures are composed of a monomer and an activating system that, upon exposure to light, are able to induce the polymerization (or curing) of the monomer. This kind of curing is called photopolymerization (a light-based polymerization, as the name says) and is usually performed with UV-light which, as it is well known, is harmful for human beings. This is the reason why more and more researches are being carried out with the aim of creating systems that can cure with less harmful irradiation source. The aim of this project is therefore to find systems that can induce the curing of adhesives with non-harmful light.

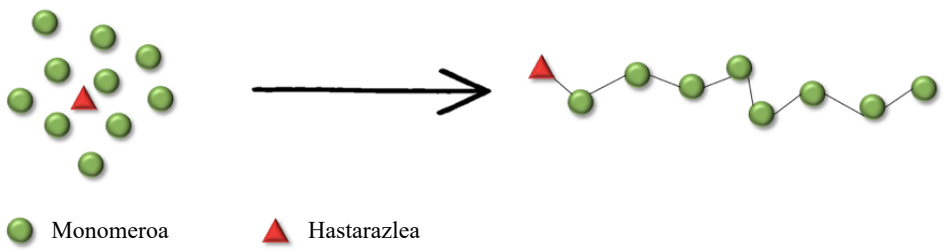
Keywords: Adhesives, Photopolymerization, Curing, NIR

1. Sarrera eta motibazioa

Gure ingurura begiratzen badugu, polimeroz inguratuta gaudela ikus dezakegu. Janzten dugun arropa, erabiltzen dugun mugikorra, edota gure gelako paretak margotzeko erabiltzen dugun pintura polimeroak dira denak. Begiekin ikusita, pentsa dezakegu aipatutako hiru gauzen artean ez dagoela erlaziorik: arropa tolestu egin daiteke, mugikorra berriz ez; eta pinturari dagokionez, likido egoeran dago erosten dugunean baina gogortu egiten da pareta margotzen dugunean. Orduan, zer da material hauek guztiek amankomunean dutena denak polimeroak izan daitezen? Denak dira polimerizazio prozesu baten ondorioz lorturiko materialak, besterik ez.

Polimerizazio prozesua zera da: monomeroak (pisu txikiko molekulak) elkar erreakzionarazi eta polimeroak (elkar loturiko monomeroek osaturiko kateak edota sareak) sortzeko prozesua (1. Irudia). Prozesu honetan erabiltzen diren monomeroen arabera, baita monomero hauek lotzeko duten eraren arabera ere, zenbait polimero lortu daitezke era askotako propietateak izango dituztenak. Hala, polimero horiei forma ezberdinak eman eta helburu ezberdinetarako erabiltzen ditugun materialak sortu ditzakegu: arropa, mugikorra eta pintura, horien artean.

1. Irudia. Polimerizazio prozesuen eskema orokorra.

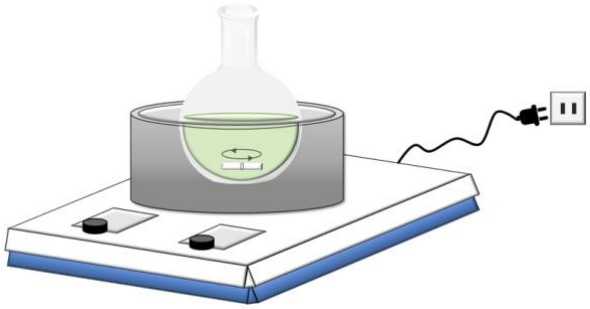


Polimerizazioa gertatu dadin, molekula aktibatzaile baten beharra dago normalean, zeinak estimulu batean aurrean, monomeroen arteko erreakzioa eragin dezakeen. Molekula aktibatzaile hauei hastarazle deritze eta hauen estruktura nolakoa, halakoa izango da hastarazleak beharko duen estimulua polimerizazio prozesuari hasiera eman ahal izateko.

Duela ez asko arte, XXI. mende hasierara arte gutxi gorabehera, erabili diren hastarazle gehienek aktibatzeko behar zuten estimulua beroa izan da. Kasu honetan, polimerizazioa aurrera eramateko monomeroa hastarazlearekin nahastu eta nahastea tenperatura altuetara eramaten da. Honela, hastarazlea aktibatu egiten da eta polimerizazioari hasiera ematen dio; hastarazle mota hauei hastarazle termiko deritze. Gaur egun oraindik, oso ohikoak dira hastarazle termikoetan oinarritutako polimerizazioak, eraginkortasun handiko prozesuak baitira; dena den, baditu hainbat desabantaila. Hona hemen garrantzitsuenak (Zhang eta Xiao, 2018):

- Beroak koste energetiko handia dakar berarekin, prozesua asko garestitzen duena.
- Nahastea asko berotzen badugu, VOC (Volatile Organic Compounds = konposatu organiko lurrunkorrak) deritzenak isurtzen dira atmosferara, oso kaltegarriak direnak ingurumenerako.
- Beroaren bidez ezin dira prezisio handiko materialak egin, puntu zehatz batean berotzea ezinezkoa baita.

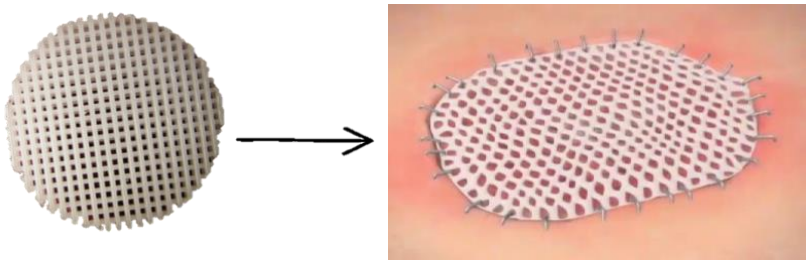
2. Irudia. Beroa estimulutzat duen polimerizazio esperimentu baten adibidea.



Hori ikusita, kimikariek irtenbideren bat jarri nahi izan diete arazoei eta irtenbide arrakastatsuenetako bat zera izan da: beroa erabiltzetik argia erabiltzera pasatzea. Izan ere, argia estimulu bezala erabiliz, aurretik aipatutako hiru arazoak konpondu (edo gutxienez hobetu) daitezke:

- Argia erabilita, polimerizazio prozesu asko berotu gabe burutu daitezke. Honek energia kostua argiaren kostura mugatzen du, prozesua merkeagoa eginez.
- Berotzerik ez dagoenez, VOC-en isurketa deuseztatu egiten da.
- Argiarekin lortu daitezkeen materialak prezisio handikoak izan daitezke, argia irradiatzen den eremu zehatza besterik ez baita polimerizatzen. (Azalaren transplanteetarako aldamio porotsuak, adibidez, argi bidezko polimerizazioa erabilita egin ohi dira) (Loh eta Choong, 2013).

3. Irudia. Argia estimulutzat duen polimerizazio bidez eginiko azalaren transplanteetarako aldamio porotsuen adibide bat.



Beraz, argi dago argiaren erabilera ekarpen handia dela polimeroen munduan lanean ari garen zientzialarientzat eta ondorioz, gero eta ikerketa lan gehiago burutzen ari direla argi bidezko polimerizazioen inguruan, hots, foto-polimerizazioan.

Hau azaldu ostean, esan daiteke **foto-polimerizazioa**ren definizioa argi dagoela (Bagheri eta Jianyong, 2019): **monomeroen arteko elkarketa non, elkarketa abiarazteko erabiltzen den sistema hastarazleak argia erabiltzen duen estimulutzat.**

Hala ere, argiaz hitzegitean ez gara argi mota bakarrari buruz hitz egiten ari. Hau da, argia mota askotakoa izan daiteke: uhin luzera nolakoa, halakoa argiaren indarra. Espektro elektromagnetikoa argiaren uhin luzera guztiak biltzen dituen espektroa da. Ondorengo irudian (4. Irudia) ikusten den bezala, uhin luzera txikienak (energia handieneko argiak) ezkerrean agertzen dira eta eskubira joan ahala, uhin luzera handiagotarantz (energia txikiagoko argirantz) mugitzen gara; hau da, laburki esanda, argiaren uhin luzera eta honek daraman energia alderantziz proportzionalak dira.

4. Irudia. Espektro elektromagnetikoa.

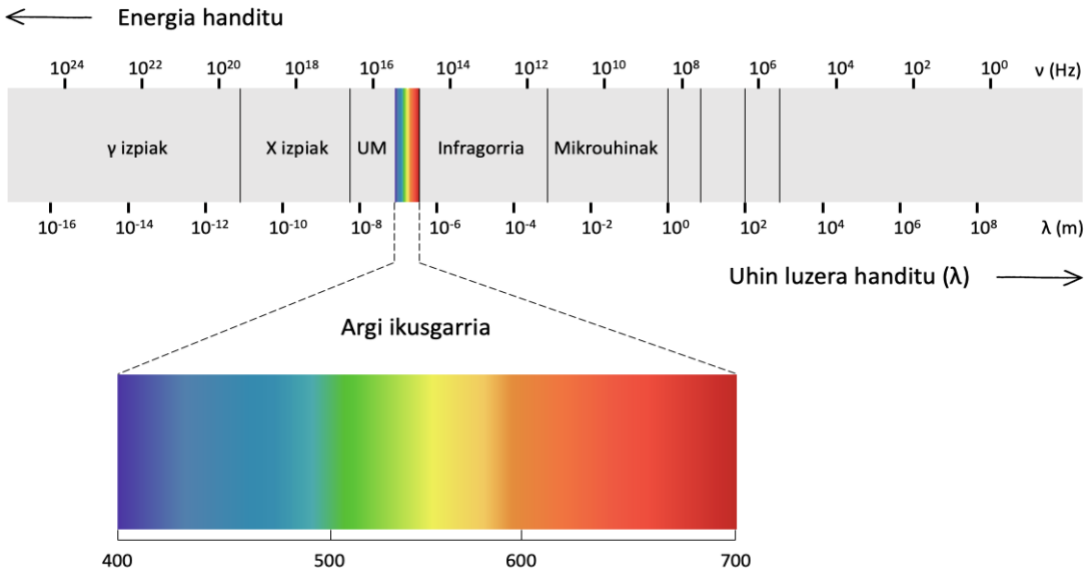


Foto-polimerizaziora itzuliz, prozesu hauetan erabiltzen den hastarazlea energia zehatzeko argiarekin besterik ez da aktibatzen. Beraz, monomeroa polimerizatzeko erabiltzen dugun hastarazlearen araberakoa izan behar da nahastea irradiatu behar dugun argiaren uhin luzera.

Hau guztia esanda, lantzen ari garen proiektua azaltzen jar gaitezke jada.

2. Arloko egoera eta ikerketaren helburuak

Donostiako ORIBAY enpresak kotxeetan dugun atzerako ispilua kristalera itsasteko itsasgarria sintetizatu eta saltzen du. Itsasgarri hau, hasiera batean, monomero eta hastarazle nahaste likido bat da eta argia erabiliz, gogortu egiten da - foto-polimerizatu egiten da -, atzerako ispilua kristalera gogor itsatsiz. Egia da erabiltzen duten sistema oso eraginkorra dela, foto-polimerizazioa 3 minututan burutzeko gai baitira. Hala ere, badute arazo garrantzitsu bat: erabiltzen duten argia energia handiko argi ultramorea da eta honek prozesua arriskutsua bilakatzen du langileentzat.

Beraz, gure taldearekin kontaktuan jarri dira eta zera galdetu/eskatu digute: ea lortu dezakegun hastarazle sistemaren bat zeinarekin itsasgarriaren foto-polimerizazio prozesuaren arriskua gutxitu edo deuseztatu dezakegun.

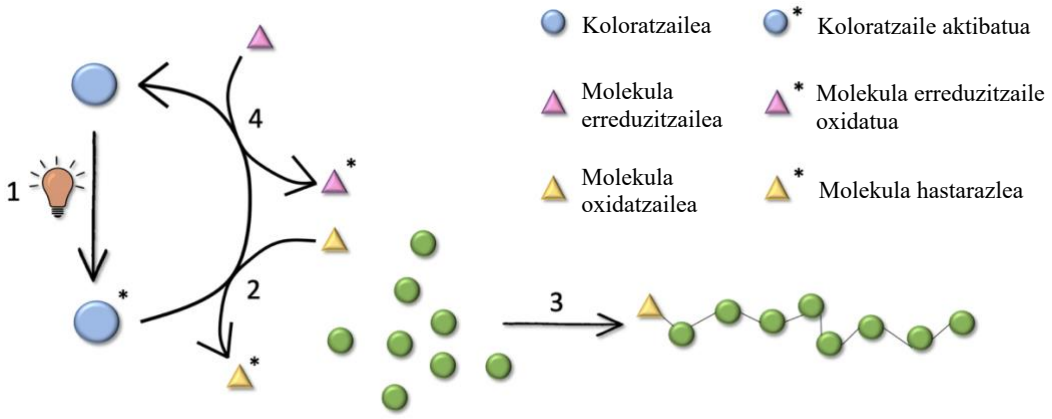
Honetarako, guk bi irtenbide proposatu dizkiegu, zeinetan gogor ari garen lanean:

- Argi infragorriarekin (energia gutxiagoko argiarekin) aktibatzen den hastarazle sistema bat.
- Intentsitate baxuko argi ultramorearekin aktibatzen den hastarazle sistema bat. Kasu honetan, nahiz eta argi ultramorea erabili, intentsitate txikikoa denez, ez da arriskutsua langileentzat.

3. Ikerketaren muina

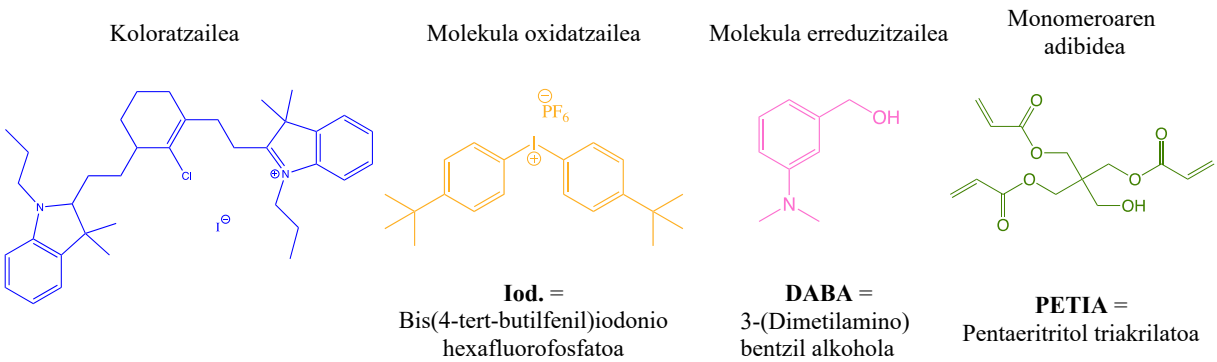
Bibliografia bilaketa lan sakon baten ostean, hainbat hastarazle sistema erabilgarri aurkitu ditugu. Batetik, argi infragorria estimulutzat duen sistema konplexu bat, zeinaren funtzionamendua ondorengoa den (Bonardi et al., 2019): koloratzaileak argi infragorria xurgatu egiten du eta aktibatu egiten da (**1**). Ondoren, bere egoera arruntera itzultzeko (desaktibatzeko), oxidazio-erredukzio prozesu batetik igarotzen da (oxidazioa = elektroiak galtzea; erredukzioa = elektroiak irabaztea): lehenengo, molekula oxidatzailea bera erreduzitu egiten da, batetik koloratzaile aktibatuaren oxidazioa eraginez eta bestetik, monomeroaren polimerizazioa abiaraziko duten molekula hastarazleak sortuz (**2**). Honela, molekula hastarazle hauek monomeroarekin erreakzionatu eta polimerizazioa abiarazten dute (**3**). Jarraian, molekula erreduzitzailea bera oxidatu egiten da, koloratzaile oxidatuaren erredukzioa eraginez (**4**). Hala, koloratzailea bere hasierako egoerara itzultzen da eta prest dago berriro ere argi infragorria xurgatu eta zikloari hasiera emateko.

5. Irudia. Argi infragorria estimulutzat erabiltzen duen hastarazle sistema baten bidez abiarazitako polimerizazioaren adibidea.



Hona hemen aipatutako molekula bakoitzak duen egitura:

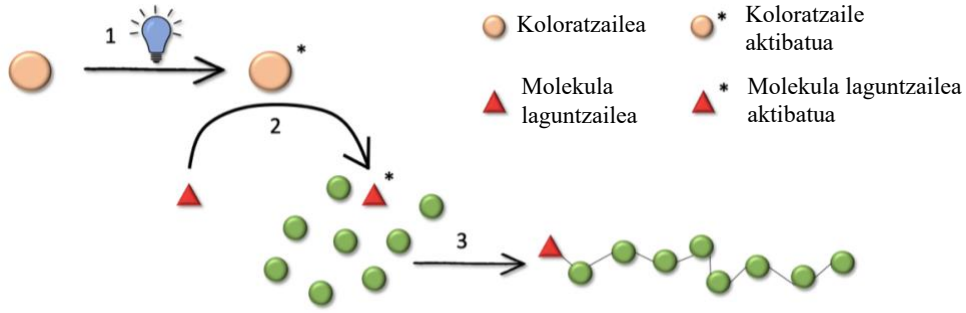
6. Irudia. Argi infragorriarekin burututako foto-polimerizazioetan erabiltzen ari garen konposatuak.



Bestetik, intentsitate oso baxuko argi ultramorea estimulutzat duen hastarazle sistema bat aurkitu dugu, zeinaren funtzionamendua ondorengoan datza (Yang et al. 2021): koloratzaileak intentsitate txikiko argi ultramorea xurgatu eta aktibatu egiten da (**1**). Honela, inguruan dagoen

molekula laguntzailearekin interakzionatzen du, azken hau aktibatuz (**2**). Aktibatutako molekula laguntzaile hau da monomeroarekin erreakzionatu eta polimerizazioari hasiera ematen diona (**3**).

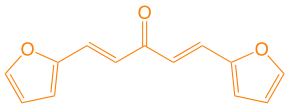
7. Irudia. Intentsitate baxuko argia estimulutzat duen hastarazle sistema baten bidez abiarazitako polimerizazioaren adibidea.



Hona hemen aipatutako molekula bakoitzak duen egitura:

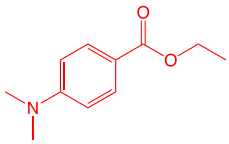
8. Irudia. Intentsitate baxuko argi ultramorearekin burututako foto-polimerizazioetan erabiltzen ari garen konposatuak.

Koloratzailea



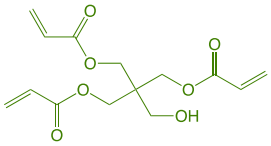
DFP =
(1E,4E)1,5-di(furan-2-il) penta-1,4-dien-3-ona

Molekula laguntzailea



EDAB =
Etil 4-(dimetilamino)bentzoatoa

Monomeroaren adibidea



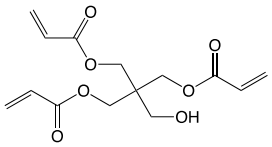
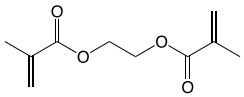
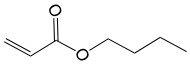
PETIA =
Pentaeritritol triakrilatoa

4. Ondorioak

Proiektuaren hasieran egonda, ez da emaitza definitiborik lortu. Hala ere, egindako saiakeren ostean ikusi dugu posible dela aipatutako bi hastarazle sistemak erabilita hainbat monomeroren foto-polimerizazioa burutzea, bai argi infragorriarekin baita intentsitate baxuko argi ultramorearekin ere.

Hona hemen argi infragorriaren bidez aktibatzen den hastarazle sistema erabilita lortu ditugun emaitzak:

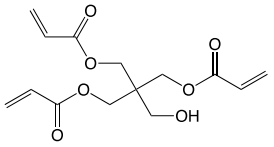
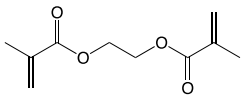
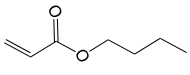
1. Taula. Argi infragorria erabilita lortutako 3 monomero ezberdinen foto-polimerimerizazioen emaitzak (780 nm, 1.2 A, lodiera 0.8 mm, Koloratzailea/Iod/DABA % 0.1/3/2 monomeroarekiko pisuan).

Monomeroa	Estruktura	Foto-polimerizazio denbora
PETIA		10 min
EGDMA		20 min
MA		Ez du polimerizatu

*PETIA = Pentaeritritol triakrilatoa. EGDMA = Etilen glikol dimetakrilatoa. BA = Butil akrilatoa.

Intentsitate baxuko argi ultramorearen bidez aktibatzen den hastarazle sistema erabilita lortu ditugun emaitzak, berriz, honako hauek dira:

2. Taula. Intentsitate baxuko argi ultramorea erabilita lortutako 3 monomero ezberdinen foto-polimerimerizazioen emaitzak (365 nm, 8 mW·cm^{-2}, lodiera 0.8 nm, DFP/EDAB % 0.1/3 monomeroarekiko pisuan).

Monomeroa	Estruktura	Foto-polimerizazio denbora
PETIA		1 min
EGDMA		7 min
MA		Ez du polimerizatu

*PETIA = Pentaeritritol triakrilatoa. EGDMA = Etilen glikol dimetakrilatoa. BA = Butil akrilatoa.

Emaitzak azaldu aurretik, aipatu beharra dago egun ORIBAY-k bere itsasgarriak egiteko erabiltzen duen monomeroa butil akrilatoa dela; hala ere, 1. eta 2. Tauletan ikusi daitekeen bezala, beste hainbat monomerorekin zenbait saiakera ere burutu ditugu, PETIA eta EGDMA, horien artean.

Emaitzei dagokienez, eta tauletan azaltzen den bezala, hautatutako hastarazle sistemak erabilita ezin izan dugu BA-ren foto-polimerizazioa aurrera eraman baina argi dago sistema oso eraginkorrak izan direla EGDMA eta PETIA foto-polimerizatzeko; izan ere, argi infragorria erabilita bi monomeroak 20 eta 10 minututan foto-polimerizatzea lortu dugu, hurrenez hurren; intentsitate baxuko argi ultramorea erabilita, berriz, polimerizazio denborak nabarmen murriztu dira, 7 minutu EGDMA-ren kasuan eta minutu bakarra PETIA-ren kasuan.

Hau ikusita, badirudi ez dugula ORIBAY-k jarritako erronka guztiz bete, ez baitugu beraiek erabiltzen duten monomeroaren foto-polimerizazioa aurrera eramatea lortu. Hala ere, gogoan izan behar dugu polimero ezberdinek antzeko propietateak izan ditzaketela. Beraz, nahiz eta butil akrilatoa ezin foto-polimerizatu izan, posible da foto-polimerizatzea lortu dugun monomeroetako batekin sortzen den polimeroaren ezaugarriak, poli(butil akrilatoa) antzekoak izatea eta beraz, gure hastarazle sistemak ORIBAY enpresarentzat baliagarriak izatea.

5. Etorkizunerako planteatzen den norabidea

Etorkizunera begira, gure planteamendua ondorengoa da:

Lehenik eta behin, sintetizatu ditugun polimeroen propietateak aztertu behar ditugu, enpresak erabiltzen duen poli(butil akrilatoa) guk lorturiko polimeroetako batengatik ordeztu dezakegun ala ez jakiteko. Ordezkapena posible bada, hautatutako hastarazle sistemen optimizazioa burutu behar dugu, molekulen estrukturak behar adina eraldatuz edo eraginkorragoak izan daitezkeen beste batzuk bilatuz. Honetarako bilaketa bibliografiko sakon bat egin behar dugu, antzeko molekulak bilatuz eta aztertuz. Azkenik, hastarazle sistema osatzen duten konposatuen kantitate egokienak aurkitu behar ditugu, foto-polimerizazio denbora ahalik eta gehien murriztu ahal izateko, betiere noski polimeroaren propietateak enpresak nahi erakoak mantenduz.

Amaitzeko, guk sintetizatutako polimeroak enpresarentzako interesgarriak ez badira, beste hastarazle sistema batzuk bilatu beharko ditugu zeinekin butil akrilatoaren foto-polimerizazioa

aurrera eraman dezakegun batetik, argi infragorria eta, bestetik, intentsitate baxuko argi ultramorea erabilita.

6. Erreferentziak

Bonardi A. H., Bonardi F., Noirbent G., Gigmes D., Dietlin C. eta Lalevée J. (2019): "Free-Radical polymeryzation upon Near-Infrarred Light Irradiation, Mergin Photochemical and Photothermal Initiating Methods", *Journal of Polymer Science*, 58, 300-308.

Loh Q. L. eta Choong C. (2013): "Three-dimensional scaffolds for tissue engineering applications: role of porosity and pore size", *TISSUE ENGINEERING: Part B*. 19, 485-502.

Bagheri A. eta Jianyong J. (2019): "Photopolymerization in 3D printing", *ACS Applied Polymer Materials,* 1, 593-611.

Yang F., Zhong M., Zhao X., Li J., Sun F., Nie J. eta Zhu X. (2021): "High efficiency photoinitiators with extremely low concentration based on furans derivative", *Journal of Photochemistry & Photobiology, A: Chemistry*, 406.

Zhang, J. eta Xiao, P. (2018): "3D printing of photopolymers", *Polymer Chemistry*, 9, 1530-1540.

7. Eskerrak eta oharrak

Batetik, POLYMAT enpresa eta bertan lanean ari naizen ikerkuntza taldeko burua, Haritz Sardon, eskertu nahiko nituzke, beraiekin lan egiteko aukera eman izanagatik. Bestetik, EHU eskertu nahiko nuke, doktoretza burutzeko finantzazioa eman baitidate. Honez gain, ORIBAY enpresa ere eskertu nahiko nuke, burutzen ari garen proiektua aurrera eramateko diru laguntza eman baitigute.

Amaitzeko, doktoretza hasiera honetan nire alboan egon diren guztiei eskertu nahi nieke, bai laborategiko lankideei, bai lagunei, baita familiako kide gertukoenei ere. Izan ere, beraiei guztiei esker nire doktoretzari hasiera polit eta zoriontsu bat ematea lortu dut, eta ziur nago gelditzen zaizkidan doktoregoko urteak antzekoak edota hobeak izango direla beraiek ondoan izanda.

Mila esker guztioi, benetan.

Fluxu-jarraiko polimerizazioa poliuretanoak prestatzeko: abantailak eta aukerak

Lopez de Pariza, X.[1], Erdmann, T.[2], Arrechea, P.L.[2], Park, N., Hedrick, J.L.[2], Sardon, H.[1]

[1]POLYMAT, Euskal Herriko Unibertsitatea, UPV/EHU, Joxe Mari Korta Center, Avda. Tolosa 72, 20018 Donostia-San Sebastian, Spain, [2]IBM Almaden Research Center, 650 Harry Road, San Jose, CA 95120, USA
xabier.lopezdepariza@ehu.eus

Laburpena

Poliuretanoak merkatuan gehien erabiltzen diren polimeroetako bat dira material hauek izan ditzaketen erabilera ugarien ondorioz. Haien propietateak oso erlazionatuta daude katearen egiturarekin, hortaz, ezaugarriak kontrolatzeko aukera handia erakusten dute. Nolakotasun hori dela eta, poliuretanoak modu doi eta errepikakorrean prestatzeko prozesuak sakonki aztertuak izan dira. Lan honetan poliuretano linealak sortzeko prozesu sintetiko jarrai bat, fluxu-jarraiko polimerizazioa, ikertu da. Prozesu honekin lortutako materialak, sintesi ez jarriaren bidez lortutako emaitzekin alderagarriak direla ikusi da. Bestalde, prozesu honek eskaintzen dituen aukerei esker, hainbat konposizioko polimeroak sintetizatu dira prestaketa bakarrean. Polimerizazioa kontrolatzeko infragorri espektrofotometro bat txertatu da erreaktore tubularrean, eta isozianatoaren kopurua erreaktorean kalkulatuz, prozesua optimizatzeko eskaintzen dituen aukerak ikertu dira.

Hitz gakoak: Poliuretanoa, fluxu-bidezko polimerizazioa, etapa-bidezko polimerizazioa

Abstract

Polyurethanes are one of the most used polymers worldwide due to their versatility in different applications. The properties of these materials can be tuned by the careful choice of the starting compounds. Therefore, synthetic processes that can generate precise polyurethanes in a systematic and automatic manner are sought. In this work, we studied the possibility of synthetizing polyurethanes using continuous-flow polymerization. Due to the advantages that this process offers, polyurethanes bearing different composition were synthetized in a single preparation. The polymerizations were controlled by an infrared device incorporated in the continuous-flow reactor, allowing the possibility to optimize the process.

Keywords: Polyurethane, Continuous-flow polymerization, step-growth polymerization

1. Sarrera eta motibazioa

1.1. Fluxu-jarraiko kimika

Transformazio kimikoak gauzatzeko, kimikariek hainbat prozesu sintetiko garatu dituzte haien helburuekin bat egiteko ahalik eta modu eraginkorrenean. Beste prozesu batzuen artean, fluxu-jarraiko kimika azken hamarkadetan arreta handia jasotzen ari den prozesu bat da, batez ere laborategi eskalan, batik bat, eskaintzen dituen automatizazio aukerei esker (Vivaldo-Lima, 2013). Bertan, erreaktore jarraiak erabiliz, transformazio kimikoak gertatzen dira, uneoro erreaktiboak erreaktorean txertatzen eta kanporatzen diren heinean. Prozesu jarrai hau, industria mailan sakon aztertua izan da bai kimika sintetikoan baita polimerizazio erreakzioetan ere.

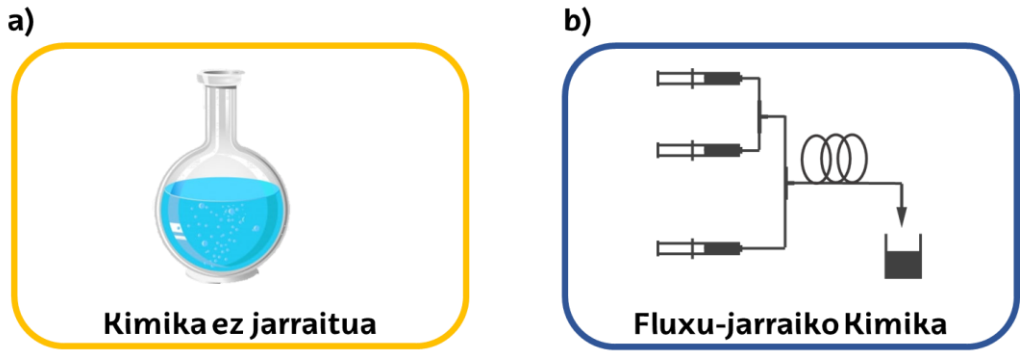
Laborategi eskalan ordea, erreakzio kimikoak beirazko ontzietan ematen dira normalean, “batch erreakzioak” (1.Irudia a). Horretarako, erreaktiboak nahastu egiten dira baldintza (kontzentrazio, tenperatura, presio, etab.) jakin batzuetan denbora batez. Behin erreaktiboak kontsumitu direnean edota nahi den konbertsio maila lortu denean, erreakzioa eten eta produktuak batu egiten dira. Prozesu

sintetiko honi ez jarraia deritzo, produktuak erreakzio denbora bukatzen denean soilik jasotzen direlako. Errore esperimental eta baldintzak mantentzeko kontrol falta dela eta, zaila izan daiteke errepikakortasun altua duten transformazio kimikoak egitea eta hortaz, prozesuaren arrakasta, langileen esperientzia nahiz gaitasunaren araberakoa izaten da.

Bestalde, azken hamarkadetan egondako bultzada teknologikoren ondorioz, automatizatu daitezkeen prozesuak garrantzi handia hartu dute zientziaren hainbat alorretan. Horrela, modu sistematikoan garatu daitezken transformazio kimiko eta prozesu sintetikoek bulkada handia jaso dute eta haietako bat, ponpa bidezko fluxu-jarraiko polimerizazioa da (Bally et al., 2010).

Polimerizazio mota jarrai hau, erreaktore tubularretan oinarritzen da. Bertan, erreakzio kimikoak gertatzen dira modu jarraian ponpak erabilita erreaktiboak erreaktorean zehar bultzatzeko. Hainbat erreaktibo, disoluzioan, erreaktore tubularrean zehar igarotzen dira, abiadura jakin batean. Abiadura honek, atxikipen denbora, edo bataz-besteko egoitza denbora mugatzen duelarik. Azkenik, produktuak tutuaren irteeratik atera eta jaso egiten dira (1.Irudia b) (Raston et al., 2017).

1.Irudia. a) Kimika ez jarraituan erabilitako erreaktore baten eskema, b) Ponpa bidezko fluxu-jarraiko erreaktore sistema baten eskema.



Laborategian erreakzio kimikoak modu ez jarraituak burutzeko ohikoagoa den prozesuarekin alderatuta “batch”, hainbat abantaila erakusten ditu fluxu-bidezko kimikak. Alde batetik, transformazioak era jarraian gertatzen dira eta beraz, ez da erreakzioa eten behar baldintzak aldatzen diren bakoitzean. Bestalde, erreakzio baldintzak (tenperatura, erreakzio denbora, kontzentrazioa, etab.) errazago kontrolatzen dira giza erroreak ekiditen direlako eta, langileen segurtasun maila handitu egiten da. Gainera, erreakzio kimikoak eskala handiagoan egitean sortzen diren arazoak (tenperatura, bolumen kontrola, etab.) gutxitzen dira prozesu honen bidez baita automatizatzeko aukera erraztu ere. Azkenik, erreaktore tubularrek ekipo analitikoak txertatzeko aukera zabaltzen dute eta hortaz, erreakzioen kontrola handitzeko parada eskaini. Aipatutako abantailen ondorioz, fluxu-jarraiko kimikak garrantzi handia hartu du azken urteotan erreakzio kimikoak laborategi eskalan modu sistematikoan burutzeko (Junkers, 2017).

Polimeroen zientzian ere, fluxu-jarraiko kimika sakonki ikertu da polimeroak sintetizatzeko. Kasu honetan, polimero anitz modu eraginkorragoan prestatzeko aukera frogatu da eta horretaz gain, konposizio ezberdineko polimeroak modu sistematikoan egiteko parada. Ikerketa horietan, kate-bidezko polimerizazioen arloan egin dute lan nagusiki, nahiz eta beste polimerizazio prozesu bidez (adibidez etapa bidezko polimerizazioa) prestatutako polimeroak gutxiago ikertu diren.

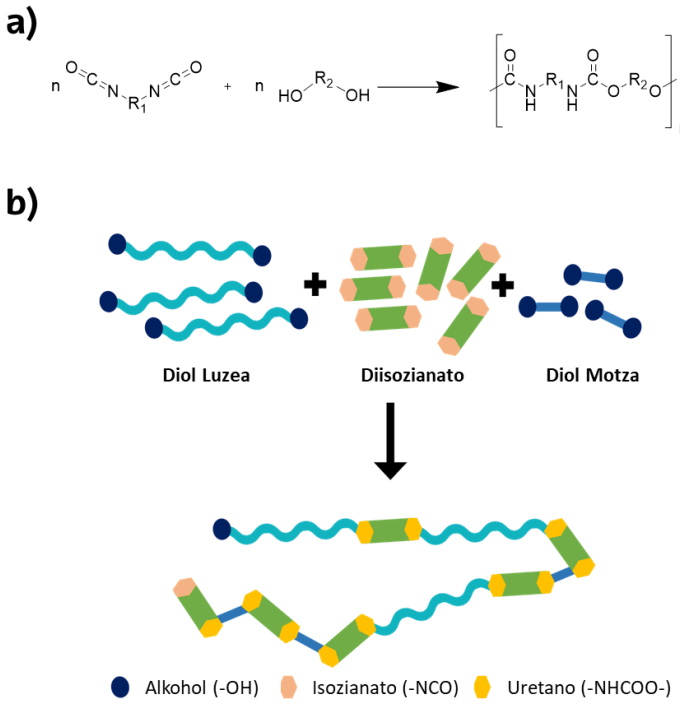
1.2. Poliuretanoen kimika

Poliuretanoak, kate nagusian karbamato (-NHCOO-) unitateak dituzten makromolekulak (polimeroak) dira. Isozianato eta alkohol talde funtzionalen arteko adizio erreakzioaren bidez

prestatzen dira eta aplikazio ugari dituen polimero mota bat da. Polimero hau, etapa bidezko polimerizazio bidez prestatzen da (Ionescu, 2005). Polimerizazio prozesu honetan, monomeroen funtzionalitatea bi izan behar du gutxienez eta talde funtzionalen arteko kopuru ekimolarra mantentzea berebizikoa da pisu molekular handiko polimeroak sortzeko.

Poliuretanoak normalean 3 monomero moten arteko erreakzioaz sintetizatzen dira: alde batetik Diisozianatoa (DI) eta bestetik Diol Motza (DM) eta Diol Luzea (DL) (2. Irudia). Diol luzea, dagoeneko polimero bat da, zeinen bukaerako talde funtzionalak alkoholak diren. Bestetik, Diol motza, bi alkohol talde funtzional dituen pisu molekular baxuko molekula bat da (adibidez, 1,3-propanodiola). Horrela, polimerizazio erreakzioa burutzen denean, karbamato loturen bidez, DL unitateak lotzen dira kimikoki. Ondoriozko polimeroak bi fase ditu, zurruna eta malgua. Fase malgua, diol luzearen propietateekin erlazionatuta dago eta fase zurruna ordea, diisozianato eta diol motzaren propietateekin (Brazel, 2012). Fase zurrunak gogortasuna eta erresistentzia ematen dio materialari, fase malguak flexibilitatea ematen dion bitartean. Hasieran erabiltzen den diol bakoitzaren proportzioaren arabera, hainbat propietateko materialak lortu daitezke, material horren zurruntasun eta malgutasunarekin jokatuz.

2.irudia. Poliuretanoen sintesia: a) Monomeroen egitura kimiko orokorra, b) Polimerizazio prozesua.



2. Arloko egoera eta ikerketaren helburuak

Alde batetik, fluxu-jarraiko polimerizazio prozesuak erakusten dituen abantailak ezagututa eta bestetik, poliuretanoak konposizioa aldatuz erakusten duten propietate ezberdintasuna dela eta, polimero horren sintesia fluxu-jarraiko erreaktore tubular batean aztertu da. Polimerizazioa baldintza zehatz batzuetan, polimeroa fluxu-jarrian sintetizatu daitekeela ziurtatu nahi da, lortutako emaitzak prozesu ez jarraituarekin alderatu eta prozesuak erakusten dituen abantailak ustiatu.

3. Ikerketaren muina

Fluxu jarraiko polimerizazioak poliuretano linealen sintesian izan dezaken abantailak erakusteko, 4 4'-metilen difenil diisozianato (MDI), diol luzea den Polietilen glikol 1500 (PEG1500) eta diol motza

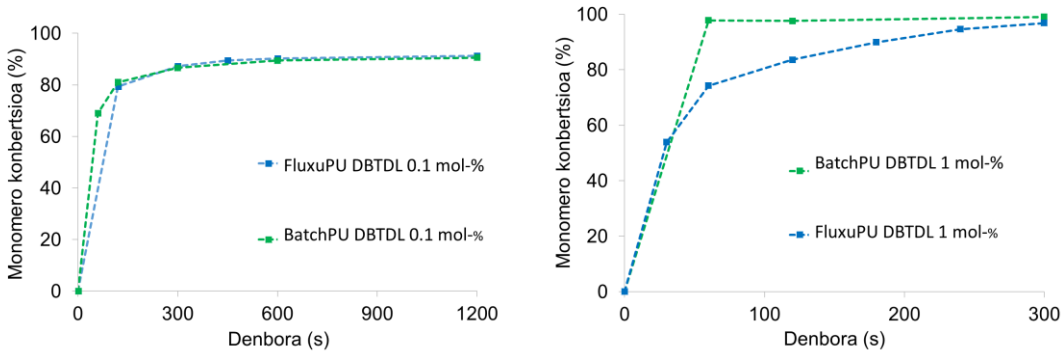
den 1,6-hexanediolean (HDO) oinarritutako sistema bat ikertu da dibutileztainu dilaurato (DBTDL) katalizatzailea erabiliz.

Lehenik eta behin, polimerizazioa kondizioak modu ez jarraituan "batch" optimizatu dira. Horretarako 3 disoluzio prestatu dira tetrahidrofuranotan (THF), diisozianato (MDI, 1.92 M), diol (PEG1500:HDO, (40:60 0.48M) eta katalizatzaile (DBTDL, 1.92 mM) disoluzioak. Disoluzio hauek nahastu egin dira diisozianato eta diol kopuru estekiometrikoa mantenduz, beirazko ontzi batean eta polimerizazio maila (konbertsioa) neurtu da denboran zehar ^{1}H EMN bidez. Polimerizazioa gelditzeko, nahasteak prezipitatu dira erreaktoretik atera bezain pronto petrolio eterretan.

Esperimentu hauetatik, ondorioztatzen da DBTDL (0.1-mol%) bidez katalizatutako erreakzioak 20 minututan, monomero konbertsio osoa ematen dutela (Konbertsioa >95 %) (BatchPU DBTDL 0.1 mol-%). Katalizatzaile kopurua 1-mol% igoz gero, polimerizazio abiadura asko igotzen dela ikusi da, konbertsio osoa minutu batean lortzen delarik (BatchPU DBTDL 1 mol-%). Lortutako polimeroen pisu molekularrak 40-47 kDa ingurukoa izan dira eta dispertsio mailak (Đ) 1.5.

Fluxu-jarraiko erreaktore tubularrak polimerizazio honetan duen erabilpena ikertzeko, aurretik optimizatutako sistema ikertu da baldintza ber-berak erabiliz baldintza jarraituetan. Horretarako, monomero eta katalizatzaile disoluzioak (aurreko kontzentrazio berdinetan), fluxu-jarraiko erreaktore tubularrean nahastu eta erreaktorean zehar ponpatu dira. Erreaktore tubularren atxikipen denbora ezberdinak erabiliz, ikerketa zinetiko bat egin da polimerizazio abiadura ezagutzeko (4.Irudia). Erreaktorearen bukaeran produktuak prezipitazioz isolatu eta ^{1}H EMN bidez analizatuak dira (FluxuPU DBTDL 0.1 mol-% eta FluxuPU DBTDL 1 mol-%). Lortutako polimeroen pisu molekularrak 40 kDa ingurukoak izan dira eta dispertsio maila (Đ) 1.2 ingurukoa.

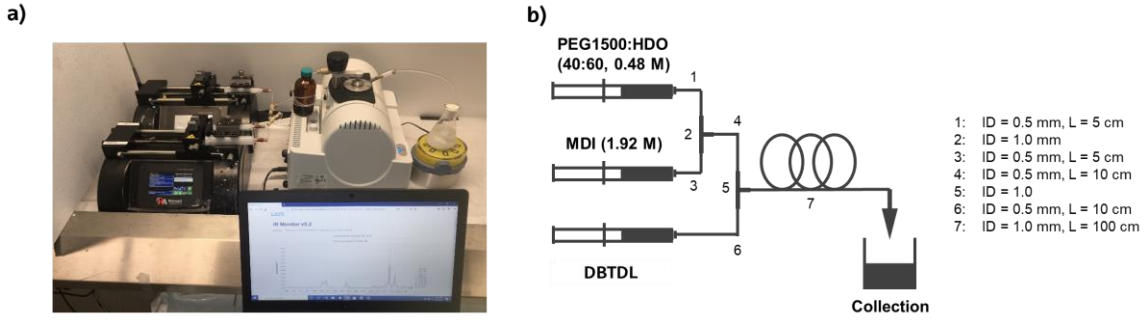
3.irudia. Fluxu-jarraiko eta batch erreakzioen arteko konparaketa zinetikoa: a) DBTDL 0.1 mon-% erabilita, b) DBTDL 1 mol-%.



Bi polimerizazio prozesuetan lortutako produktuak alderatuz gero, (ez jarraitua eta fluxu-jarraikoa) ikusi da fluxu-bidezko polimerizazioa erabiliz, pisu molekular antzekoko polimeroak lortu daitezkeela nahiz eta fluxu-jarraiko polimerizazioa erabiliz atxikipen denbora luzatu behar den guztizko konbertsioa lortzeko (3. Irudia). Gainera, fluxu-jarraiko polimerizazioa erabiliz, dispertsio estuagoa duten polimeroak lortu dira, hau da kateen luzera homogeneoagoa izatea lortu da, nahiz eta desberdintasuna ez den nabarmena. Katalizatzaile kopuru altua erabiltzean (FluxuDBTDL 1 mol-%), ikusi da polimerizazio abiadura motelagoa dela fluxu-jarraiko erreaktore tubularra erabiliz. Emaitza hau, erreaktore tubularrak duen bolumenarekiko azalera handiaren ondorio da, polimerizazio erreakzio exotermikoan sortutako beroa xahutuz. Horrela, katalizatzaile kopuru handia erabiltzen denean, sistema asko berotzen da hasieran, polimerizazio erreakzioa azkartuz baina aldi berean, erreakzio sekundarioak gertatzeko aukera handituz. Fluxu-jarraiko erreaktoreak erabiliz, erreakzio sekundarioak mugatu daitezke nahiz eta polimerizazio abiadura jaisten den eta horrela behar bada polimeroen

dispertsio maila jaitsi. Emaitza hauek kontuan hartuta, poliuretano sistema hau modu eraginkorrean fluxu-jarraiko erreaktorea tubularrak erabiliz prestatu daitezkeela ikusi da.

4.irudia. Fluxu-jarraiko poliuretano sintesiaren muntaia. a) Erreaktore mutaiaren argazkia, FTIR ekipoari lotuta duelarik, b) Erabilitako muntaiaren xehetasunak (ID: Barruko diametroa, L: Luzeera).



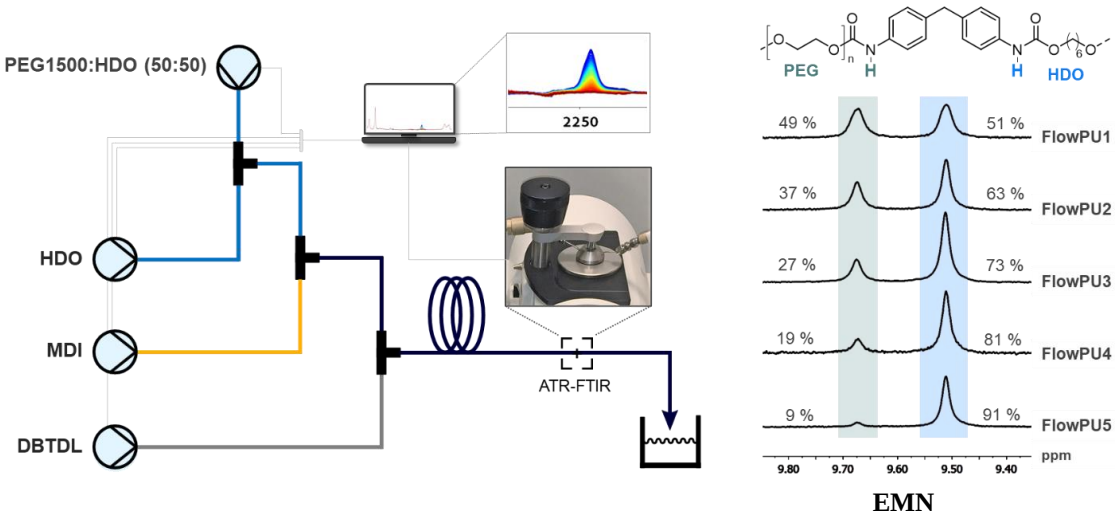
Poliuretano linealak disoluzioan fluxu-jarraiko erreaktore tubular batean zuzen prestatu daitezkeela ikusita, fluxu-jarraiko polimerizazioak eskaintzen dituen abantailak ustiatzen saiatu gara. Ideia horrekin, prestaketa bakarrean konposizio ezberdineko poliuretanoak sintetizatzea izan dugu helburu. Horretarako, hiru monomero disoluzio prestatu dira. Alde batetik PEG1500:HDO (50:50, 0.48 M) disoluzio bat non bi diolak kopuru estekiometrikoan nahastu diren. Bestalde, HDO (0.48 M) disoluzio bat eta azkenik Diisozianato (1.92 M) (MDI) disoluzio bat. Monomero disoluzioak eta katalizatzaile disoluzioa (DBTDL, 1.92 mM) erreaktorearen sarreran nahasten dira, non polimerizazioa ematen den (5. Irudia).

Diol disoluzioen arteko jariakinaren emaria aldatuz, diol bakoitzaren kontzentraioa aldatu daiteke erreaktorean eta horrela, produktuaren konposizioa denboran zehar aldatu. Modu honetan, hainbat propietateko polimeroak lortu daitezke prestaketa bakar batean.

Bestalde, polimerizazio erreakzioaren inguruan kontrola handitzeko, infragorri espektrofotometro bat txertatu da erreaktore tubularrean fluxu-ganbara bat erabiliz. Ekipo honi esker, isozianatoaren presentzia neurtu daiteke sisteman honen banda nabarmena (2250 cm^{-1}) jarraituz. Horrela, erreakzioaren konbertsio maila kalkulatzen da isozianatoaren presentzia sisteman eta konbertsio maila zuzenki erlazionatuta daudelako.

Isozianatoaren kontzentrazioa, emandako seinalearen intentsitatearekin erlazionatzeko, kalibrazio zuzen bat egin da isozianato (MDI) kontzentrazio ezberdinak erabiliz. Kalibrazio hau erabiliz, polimerizazioen atxikipen denborak optimiza daitezke, eta behar izanez gero, atxikipen denborak moldatu nahi diren konbertsio mailak lortzeko (5. Irudia).

5.Irudia. Hainbat poliuretano egiteko plataforma sintetikoa. Lortutako polimeroen konposizioa erakusten duten ^{1}H-EMN espektro zatia.



EMN

Aipatutako sistema optimizagarria erabiliz, 5 poliuretano desberdin prestatu dira, diol motzaren konposizioa %55etik %95era aldatzen delarik, prestaketa bakar batean. Konposizioaren berri izateko, ^{1}H EMN teknika analitikoa erabili da. Teknika honen bidez, karbamato (uretano) unitatera zein diol lotuta dagoen jakin daiteke eta horrela produktu bakoitzaren konposizioa kalkulatu. Esperimentalki lortutako ehunekoak bat datoz erabilitako erreaktore tubularrean txertatutako monomero bakoitzaren proportzioekin, %±4ko errorearekin. Horrez gain, polimeroen egitura Gel iragazkorreko kromatografia (GPC) polimeroen pisu molekularra eta distribuzioa ezagutzeko, Ekorketa diferentzialeko kalorimetria (DSC) propietate termikoak neurtzeko, Fourierren transformatuaren bidezko espektroskopia infragorria (FTIR) eta Analisi termograbimetrikoa (TGA) teknika analitikoak erabiliz egiaztatu da.

1.Taula. Sintetizatutako poliuretano linealen ezaugarriak. xHDO ehunekoa, konbertsioa, pisu molekularra, distribuzioa eta Beira trantsizioko tenperatura.

Saiakera	xHDO, teo. (%)	xHDO, esp. (%)	Konb. (%)	M_w (kDa)	Đ	T_g (˚C)
FluxuPU1	55	51	90	14.4	1.4	-38
FluxuPU2	65	63	94	18.2	1.4	-35
FluxuPU3	75	73	95	20.6	1.5	-33
FluxuPU4	85	81	98	19.8	1.6	-26
FluxuPU5	95	91	98	18.0	1.6	-19

Material hauen pisu molekularrak diol motzaren ehunekoa (xHDO) handitzen den heinean txikitzen doa, ohikoa den moduan. Polimeroen distribuzioa konstante mantentzen da. Propietate termikoei dagokionez, segmentu zurrun handiagoa duten materialetan, T_g (Beira trantsizioko tenperatura) altuagoa dela ikusten da. Behaketa hau bat dator literaturak ikusitako emaitzekin, eta katean daude uretano taldeen proportzioarekin erlazionatuta dago, hau da, gero eta segmentu zurrun ehunekoa altuagoa izan, materialaren beira trantsizioko tenperatura handiagoa da.

4. Ondorioak

Lan honetan ponpa bidezko fluxu-jarraiko polimerizazio prozesua poliuretano linealak disoluzioan sintetizatzeko erabilgarria dela erakutsi da. Prozesu honen bidez lortutako emaitzak, prozesu ez jarraituen bidez lortutako emaitzekin alderagarriak direla ikusi da eta izan ditzaken abantailak ikertu dira. Batik bat, konposizio ezberdineko poliuretanoak sintetizatu daitezke prestaketa bakarra erabiliz. Bestalde, ekipo analitikoak txertatzeko erraztasuna dela eta, erreakzioaren konbertsio maila momentuan ezagutzeko plataforma sortu da. Honek, sintesi prozesuak optimizatzeko aukera ematen duelarik.

5. Etorkizunerako planteatzen den norabidea

Hemen erakutsi den plataforma sintetikoak erakusten du fluxu-jarraiko polimerizazioa erabiliz, poliuretano polimerizazioak arrakastarekin burutu daitezkeela. Badira ordea hainbat erronka aurretik. Alde batetik, prozesuaren automatizazioan lana egin behar da, era automatizatuan polimero ezberdinak egiteko kopuru eta ahal den heinean kopuru handian. Bestalde, erabili den prozesuaren moldakortasuna erakutsi beharko litzateke natura ezberdineko monomeroak erabiliz.

6. Erreferentziak

E. Vivaldo-Lima, et al., (2013): *Handb. Polym. Synth. Charact. Process.*

Bally, F et al., Homogeneous Polymerization: Benefits Brought by Microprocess Technologies to the Synthesis and Production of Polymers. *Macromol. React. Eng.* 2010, 543-561.

Brazel, C. S., (2012): *Fundamental Principles of Polymeric Materials*; John Wiley and Sons Inc., New Jersey.

Ionescu, M., (2005): *Chemistry and Technology of Polyols for Polyurethanes*: Rapra Technology Limited.

Junkers, T. Precise Macromolecular Engineering via Continuous-Flow Synthesis Techniques. *J. Flow Chem.* 2017, 106-110.

Raston, C. et al., Multi-step continuos-flow synthesis. *Chem. Soc. Rev.* 2017, 1250.

7. Eskerrak eta oharrak

- Autoreak IBM Almaden Research Centre ikerketa zentroa eskertu nahi du egindako egonaldiagatik, baita lan honen gainontzeko autoreei ere, haiek eskainitako laguntza zientifiko eta pertsonala dela eta.
- Autoreak Fomento San Sebastian erakundea eskertu nahi du emandako finantzazioarengatik baita POLYMAT ikerketa zentroa autoreari emandako aukera dela eta.

Gainazaleko teknika elektrikoen erabilera tektonika aktiboaren ikerketan: tomografia elektrikoa (ERT) eta polarizazio induzitua (IP)

Madarieta-Txurruka, A.[1], Tendero-Salmerón, V.[1], Galindo-Zaldívar, J.[1,2], González-Castillo, L.[1]

[1]*Departamento de Geodinámica, Universidad de Granada, 18071 Granada, Espainia,*
[2]*Instituto Andaluz de Ciencias de la Tierra, CSIC-Universidad de Granada, 18071 Granada, Espainia.*
amadatxu@ugr.es

Laburpena

Gainazaleko teknika elektrikoak (Erresistibitate elektrikoko tomografia "ERT" edo tomografia elektrikoa eta polarizazio induzitua “IP”) tresna oso erabilgarriak dira lur zientzien arloan, ikerketa testuinguru desberdinetan. Horien artean, tektonika aktiboaren azterketa aurkitzen da, ezinbestekoa arrisku sismikoak behar-bezala ikertzeko. Mendikate Betikoetan tektonikoki aktiboak diren bi lurraldeetan lortutako tomografia elektrikoko profilak aztertzen dira, tektonika aktiboaren ikerketan teknika geofisiko horiek izan dezaketen garrantzia eta erabilgarritasuna erakusteko. ERT eta IP datuak failen egitura zehazteko eta beraien jarduera analizatzeko erabilgarriak direla ondorioztatzen da.

Hitz gakoak: Tomografia elektrikoa, Polarizazio induzitua, Tektonika aktiboa, Arrisku geologikoa

Abstract

Electrical surface techniques (Electrical-resistivity tomography “ERT” and induced polarisation, “IP”) are useful tools in the field of earth sciences, in different research contexts. These include the study of active tectonics, which is essential for the appropriate investigation of seismic risks. By analysing the electrical tomography profiles installed in two tectonically active areas of the Betic Cordillera, their importance and usefulness in the knowledge of active tectonics is discussed. ERT and IP data are useful to define the structure of faults and analyse their activity and can be used as a complement in active tectonics.

Keywords: Electrical-resistivity tomography, Induced polarisation, Active tectonics, Geological risk

1. Sarrera eta motibazioa

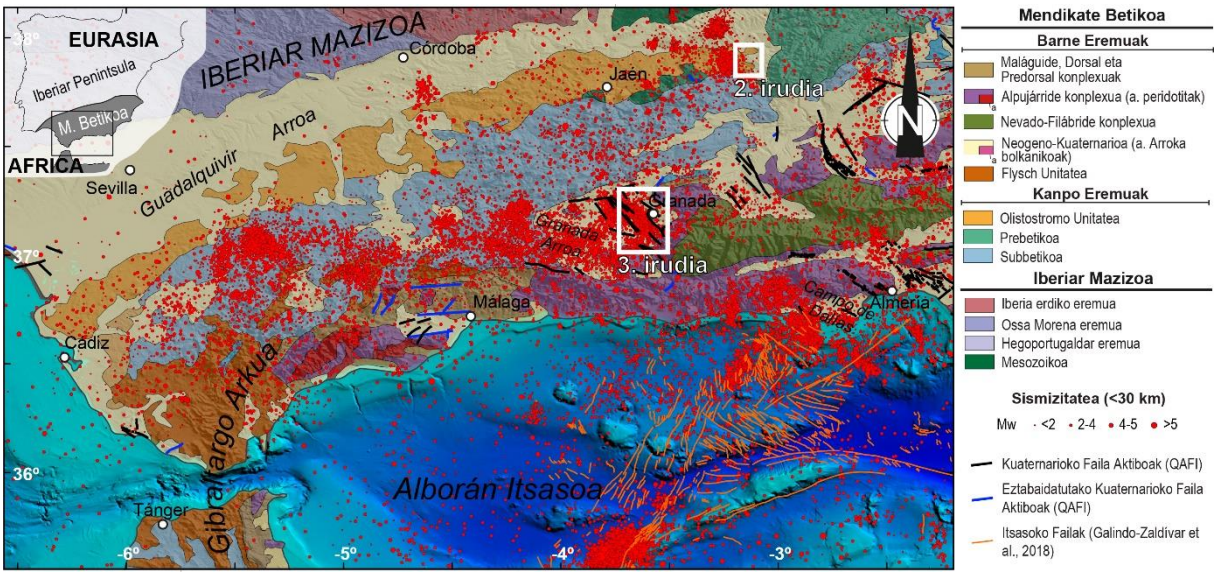
Lurrazala ikertzeko hainbat modu eta metodologia daude baina teknika geofisikoak ezin bestekoak dira gainazalaren azpitik dauden egitura, arroka eta ezaugarri geologikoak ezagutzeko. Lurraren ezaugarri fisikoak aztertzen dituzten teknikak landa-geologia, geoteknia eta geomorfologiaren osagarri dira besteak beste (Telford et al., 1990). Teknika elektrikoek konkretuki hainbat aplikazio dituzte eta horien artean hurrengoak nabarmendu daitezke: akuiferoen eta lur-azpiko uren azterketa (Guirado et al., 2017; Martínez-Moreno et al., 2018), lurjauzien ikerketa (Perrone et al., 2014), kobazuloen detekzioa (Martínez-Moreno et al., 2021), bolkanologia (Di Giusseppe eta Troiano, 2019), lurzoru mota ezberdinen azterketa (Sudha et al., 2009) edo aztarna arkeologikoen detekzioa (Papadopoulos et al., 2010). Aipatutako lan-arloez aparte, artikuluan tektonika aktiboaren ikerketan ere oso erabilgarria dela erakutsiko da.

Tektonikak Lurreko lurrazalaren deformazioarekin erlazionatutako prozesu, egitura eta egituren geometriei erreferentzia egiten die. Esanahi zabalago batez, egitura, prozesu eta geometria horien denboran zeharreko eboluzioa aztertzen duen arloa izango litzateke (Keller eta Pinter, 1996). Tektonika aktiboz ari garenean, aldiz, gizartearen denbora-eskalaren ikuspegitik esanguratsuak diren prozesu tektonikoetaz ari gara (National Research Council eta Geophysics Study Committe, 1986), beraz, gure bizimoduan garrantzia eta eragina duten zenbait prozesu tektoniko ikertzen dituen jakintzagaia izango litzateke. Lurrean, plaka-tektonikaren eraginaren ondorioz (Le Pichon et al., 2013), hainbat eremu tektoniko aktibo bereizten dira. Eremu tektoniko aktiboetan gertatzen diren prozesuak gizartearengan eragina dute eta arriskutsuak izan daitezke. Horren ondorioz, prozesu tektoniko aktiboen ikerketa ezin bestekoa da. Keller eta Pinterrek

(1996) hainbat teknika nabarmentzen dituzte tektonika aktiboa beharbezala aztertzeko: sismologia eta paleosismologia, geodesía, geomorfologia edo erreken azterketa. Teknika horiek ezinbestekoak dira azterketa sakon bat egiteko, hala ere, badira beste zenbait teknika, geofisikoak adibidez, azken urteotan erabilgarritasun handia lortu dutenak. Horien artean, gainazaleko teknika elektrikoak; erresistibitate elektrikoko tomografia edo tomografia elektrikoa (ERT) eta polarizazio induzitua (IP) nabarmenduko dira lan honetan.

Gaur eguneko eremu tektoniko aktiboen artean dugu Mendikate Betikoa, Iberiar Penintsularen hego-ekialdean kokatua, Rif Mendikatearekin batera Gibraltargo Arkua osatzen duena. Arku tektoniko horretan sismizitatea nabarmena da eta hainbat kokalekutan lurrikarak ohikoak dira (1. irudia). Horren adibide dira 2021ko urtarrilla-otsaileko Granadako lurrikarak edo 2019an, abuztua eta abendua bitartean, Moron de la Fronteran (Cádiz) gertatutakoak. Gainera, lurralde horiek geologikoki eta esfortzu tektonikoei erreparatuz ez dut zerikusirik, arkuaren eta Mendikate Betikoaren konplexutasunaren adierazgarri. Horren ondorioz, Mendikate Betikoa, tektonika aktiboaren azterketarako leku ezin hobea da: batetik, tektonikoki eta sismikoki aktiboa delako, eta bestetik, konplexutasuna dela eta egoera desberdinak aztertu daitezkeelako. Ondoren, Mendikate Betikoan aurrera eraman diren teknika elektrikoen zenbait kanpainen emaitzak analizatuko dira, tomografia elektrikoaren eta polarizazio induzituaren ekarpenak azpimarratzeko.

1. irudia. Mendikate Betikoko mapa geologikoa. Bertan 2000. urtetik izandako sismizitatea eta faila aktiboak adierazten dira.



2. Arloko egoera eta ikerketaren helburuak

2.1. Tektonika aktiboa

Tektonika aktiboaren ikerketak Mendikate Betikoetan ez du garrantziarik hartzen 90. hamarkadara arte (Galindo-Zaldivar et al., 1999; Morales et al., 1999). Orduan, batez ere, azterketa sismikoan eta egituren azterketan oinarritzen ziren, mendikatean ematen diren esfortzu aktiboak zehazteko. Harrez geroztik, tektonika aktiboa nabarmen hedatu da eta, batez ere, azken hamarkadan lan ugari eta hainbat arlotakoak burutu dira (adibide bezala: Martínez-Martínez et al., 2006; Pedrera et al., 2009; Ruiz-Constán et al., 2009). Modu berean, beste teknika batzuen erabilera hedatu da tektonika aktiboaren ikerketan: geomorfologia (Pérez-Peña et al., 2010), prospekzio geofisikoa (González-Castillo et al., 2014) edo geodesia (Galindo-Zaldívar et al., 2015). Nabarmentzekoa da ere, azken urteetan hainbat teknika batera analizatu eta ikertzeko saiakera eta helburua (Ruiz-Constán et al., 2012; Tendero-Salmerón et al., 2020).

2.2. Tomografia elektrikoa

Tomografia elektriko deritzon teknikak lurrazaleko arroka, sedimentu eta lurzoruen bi parametro kalkula ditzake. Batetik, erresistibitate elektrikoa eta, bestetik, polarizazio induzitua. Lehenengoak korronte elektrikoak gorputz jakin batetik igarotzeko duen gaitasuna adierazten du eta ondorioz, material bakoitzak duen ezaugarri propioa da litologiarekin erlazionatuta dagoena. Bigarrena, polarizazio induzitua, material bati korronte elektrikoa induzituz gero, honen eragina korrontearen amaitzen denetik material horrek hasierako egoerara itzuli arte behar duen denbora izango litzateke. Beraz, gainazaleko teknika elektriko hauek, teknika geofisiko aktibotzat hartzen dira tomografo elektriko baten bitartez sortutako korronte elektrikoa lurrazaletik pasarazi behar delako.

Mundu mailan, XX. mendearen bukaeran hasten dira teknika hauek erabiltzen tektonika aktibo, faila aktibo eta arrisku tektonikoen azterketarako. Mendikate Betikoan konkretuki, ez da teknika zehatz hau erabiliko orain dela gutxira arte (Pedrera et al., 2012). Geroztik, bai mundu mailan zein azterketa eremuan, teknika hauek oso erabiliak izan dira (Caputo et al., 2003; Kürçer et al., 2008; Martinez-Martos et al., 2017; Štěpančíkováa et al., 2011; Tendero-Salmerón et al., 2020; Weissl et al., 2017; besteak beste).

2.3. Helburuak

Lanaren helburu nagusia gainazaleko teknika elektrikoen erabilerak tektonika aktiboaren azterketan eskaini dezakeena aztertu nahi da. Horretarako:

1) Mendikate Betikoan garatu diren bi kanpainia eta 4 profil aurkeztu eta aztertuko dira.
2) Tektonika aktiboaren ezagutzan sakontzeko teknika elektrikoek eskaintzen duten baliabideetaz hausnartuko da.

3. Ikerketaren muina

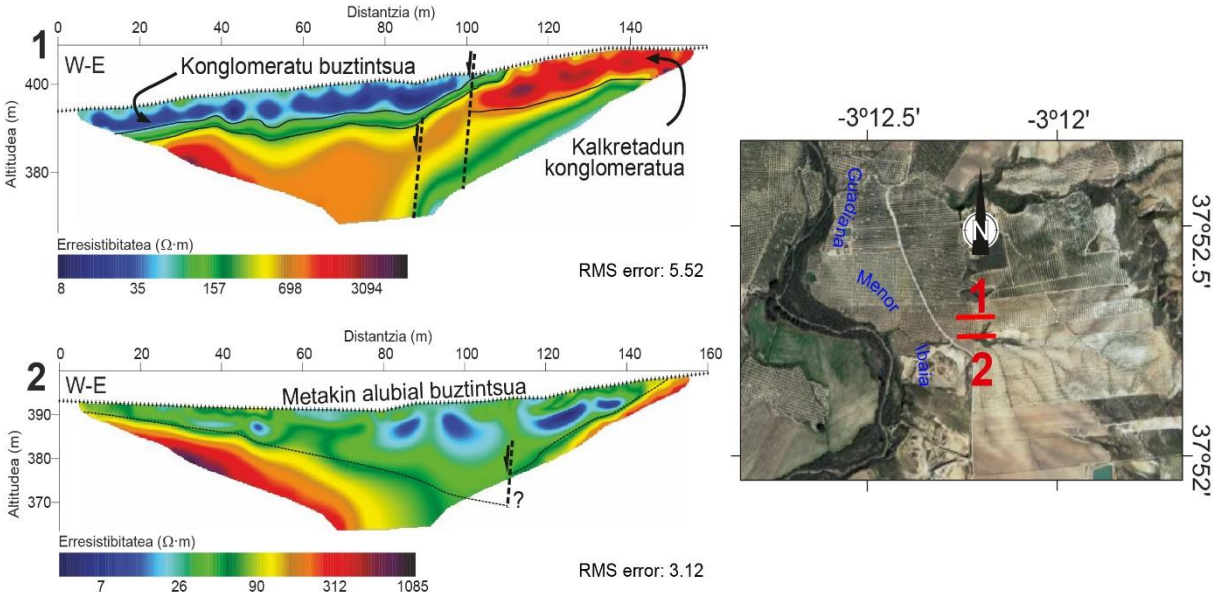
Lan honetan lau ERT profil jaso dira Mendikate Betikoetako bi eremu tektoniko aktibotan. Batetik, Guadalquivir arroaren ekialdean, Guadiana Menor ibaiaren alboan, 2017 eta 2018ko lurrikarak aztertzeko (Tendero-Salmerón et al., 2020; 2. irudia) eta bestetik Granada arroan, aurtengo urtarrilean eta otsailean Granadan eman ziren sismoen kokalekutik gertu eta faila sistema berean (Sanz de Galdeano et al., 2003; 3. irudia).

Datuak ABEM Terrameter SAS 4000 tomografoaren bitartez lortu dira, GRAD4LX8 eta GRAD4S8 protokoloak erabiliz. Profilak 160m (Guadalquivir arroa) eta 80m-koak (Granada arroa) dira, erabilitako 80 elektrodoen artean 2m eta 1m utziz hurrenez hurren. Datu elektrikoen inbertsioa Res2Dinv programaren bitartez burutu da.

3.1. Emaitzak

Guadiana Menor ibaiaren inguruan egin diren E-W norabideko bi ERT profilek (2. irudia), sakonera txikiko faila gazte batek sortua izan daitekeen N-S orientazioko malda aldaketa zuzen bat zeharkatzen dute. 1 profilean okerdura handiko muga bat ikus daiteke, ekialderantz amaitzen den erresistibitate baxuko gorputz batek eta azpiko erresistibitate altuko gorputzaren desplazamenduak markatua. Muga hori, profilen kokalekutik gertu dauden harrobietan ikus daitezkeen failekiko paraleloa da, eta mendebaldeko blokearen hondoratzea adierazten du. 2 profilak haran txiki baten amaieran kokatutako gorputz sedimentario bat mozten du. Bertan, erresistibitate baxuko eta forma triangeluarreko metakinen gorputz bat bereiz daiteke, asimetrikoa dena eta malda aldaketarekin erlazionatua dagoena. Failaren mugimenduak hondoratutako mendebaldeko blokearen gainean garatutako espazioan eroaleak diren buztinak metatu dira.

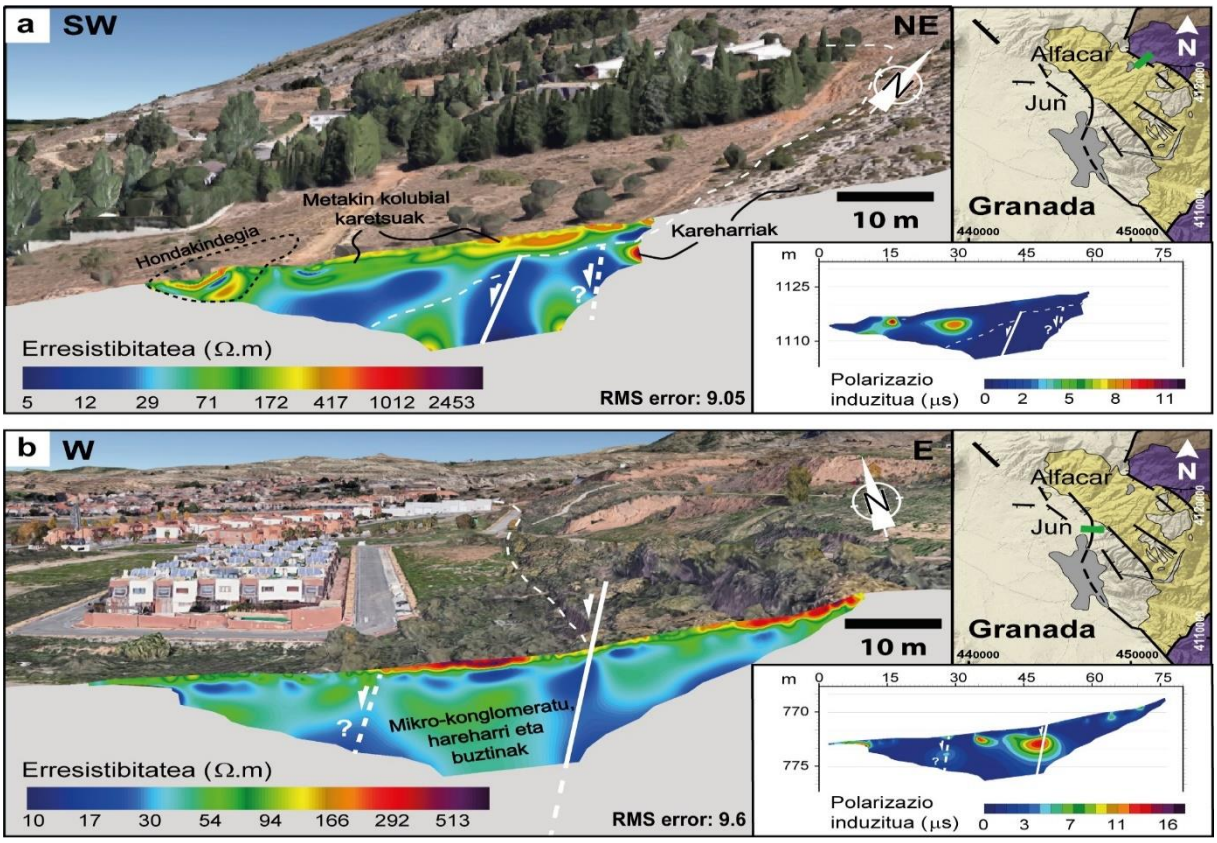
2. irudia. Guadiana Menor ibairekiko paralelo dagoen malda-aldaketa bortitza zeharkatzen duten ERT profilak (Tendero-Salmerón et al., 2020).



Granada arroko profilek, ezagunak diren bi faila gurutzatzen dituzte (3. irudia). a profilak Alfacar faila zeharkatzen du. Azalean oso ondo ikusten den faila-planoan burdina mineralizazioak ugari dira. Profilean materialen arteko erresistibitate-aldaketa nabarmena da. Ipar-ekialdean ikus daitezkeen kareharriek erresistibitate altuko balioak ematen dituzte (Ikus a profileko erresistibitate altuko puntu gorria). Tamalez, erresistibitate altuko puntu gehiago ezin izan dira lortu kareharrien gogortasuna eta abuztuan lurrak duen idortasunaren ondorioz. Bi eremu desberdindu dira, erresistibitate-anomalien geometriari erreparatuz. Batetik, ipar-ekialdean eta sakonera handiagoan kokatutako okerdura handiko anomaliak. Bestetik, profilaren hego-mendebaldean hego-mendebalderantz oso gutxi okertutako anomaliak. Okerdura handiko anomaliak aipatutako kareharrietan kokatutako faila baten ondorio direla interpretatu da, Alfacar faila nagusiarekin harremana duena. Okerdura gutxiko anomaliak aldiz, faila estaltzen duten metakin kolubial gazte gisa interpretatu dira. Horrela, hego-mendebaldeko blokea da failak hondoratzen duena. Bloke hori zein faila altxatutako bloketik higatutako erresistibitate altuko kareharrizko metakinez estalita daude. b profila, Granada failaren gainean kokatuta dago eta erresistibitate desberdintasun txikiagoa du. Erresistibitate handieneko materialak azalean aurkitzen dira eta sakonean bi eremu sasi-bertikal eroaleago bereizten dira. Profilaren erdian kokatutako anomalia azalean oso nabarmena den malda aldaketa bortitzarekin bat dator. Hemen, altxatutako eta hondoratutako blokeetako azaleko materialak berdinak dira. Ondorioz faila ez dago bi blokeren arteko erresistibitate aldaketa baten bitartez adierazita, baizik eta, faila planoan egon daitezkeen jariakinek eragindako eremu eroaleago baten bitartez markatuta.

Granada arroan, ERT datuez gain polarizazio induzitu (IP) datuak ere lortu dira. Esan bezala, material bati korronte elektrikoa induzitzean, horren eragina amaitzen denetik material horrek hasierako egoerara itzuli arte behar duen denboraz ari gara. Normalean, polarizazio induzitua altua da faila-planoan mineralizazioak edo birrindutako buztinak daudenean. b profilean IP altuko eremua guztiz bat dator eremu eroalearekin, beraz, failaren interpretazioa indartzen du. a profilean IP datu altuak sakonera txikian kokatuta daude. Garrantzitsuena, profilaren erdialdean kokatutakoa, eremu eroale batekin bat dator. Alfacar failan ohikoak diren burdin mineralizazioen ondorio izan litzateke. Hala ere, anomalia eroalearen okerdura txikia ez dator Alfacar failaren okerdurarekin bat. Hego-mendebaldean kokatutako IP anomalia, aldiz, gizakiak eraldatutako materialetan kokatua dago.

3. irudia. Granada arroko ipar-ekialdeko Granada (b) eta Alfacar failak (a) gurutzatzen dituzten ERT eta IP profilak. Mapen kokapena: UTM, 30N zona.



3.2. Eztabaida

Tektonikoki aktiboak diren eremuetan, failen eraginaren ondorioz, sedimentuen metaketa ematen da. Aktibitatea garrantzitsua den kasuetan arroen garapena eman daiteke. Horren ondorioz, litologikoki eta ezaugarri fisikoei erreparatuz ezberdinak diren materialak bereiz daitezke: arroetako sedimentuak, batetik, eta basamentuko arroka-ama, bestetik. Materialen arteko erresistibitate aldaketak dira ezaugarri fisiko horien eredu eta litologiarekin erlazio handia dute. ERT datuek sedimentuen eta arroka-amaren sakonera txikiko egituraren berri ematen dute eta ondorioz, hauen arteko erlazioa aztertu daiteke. Gainera, IP datuek failen berri eman ahal dute.

Bai Granadako (2. irudia) zein Guadiana Menorreko (3. irudia) ERT profilek, IP datuen laguntzaz, failen eta sedimentuen egituraren berri ematen digute. Horrela, failen sakonera gutxiko ezaugarria eta sedimentu gazteenekin duten erlazioa ezagutu daitezke, aktibitatearen berri emateko. Sakoneko datuak bat datoz failek eragindako aldaketa geomorfologikoekin (malda aldaketa bortitz eta zuzenak) zein datu geologikoekin (profilen kokalekutik gertu dauden eta orientazio antzekoa duten faila-planoak). Horrela, landan ikusitako failen sakonera txikiko jarraipena interpreta daiteke:

1) Erresistibitate balioen aldaketa bortitzak failak eragindako aldaketa litologikoekin lotu daitezke (2. irudia, 1 profila; 3. irudia, a profila).

2) Erresistibitate bereko gorputzen desplazamendua somatuz gero failak eragindakoa dela interpreta daiteke. Horrela, faila-mota eta ondorioz inguruko esfortzu nagusien izaera ondoriozta daiteke (2. irudia, 1 Profila faila normala).

3) Metakinen morfologiari erreparatuz, failekin erlazionatutako moldatze-espazioak interpreta daitezke (2. irudia, 2 profila).

4) Eroaletasun anomaliak ere failekin lotu daitezke, jariakin eroaleen agerpenarekin dute harremana (3. irudia, b profila)

5) IP balio altuak mineralizazioen eta buztin birrinduen seinale dira eta failen mugimenduarekin eta jariakinen agerpenarekin dute harremana (3. irudia, b profila).

Granada failari erreparatuz, 2. irudiko b profilean ikus daiteke failarekin erlazionatuta dagoen malda antropikoki eraldatua dagoela, etxebizitzak eta errepidea egiteko. ERT eta IP datuek, egiaztatu dute, malda aldaketa bortitz hori, sakonean dagoen anomalia bertikalarekin bat datorrela, hau da, faila baten ondorioz sortutakoa dela.

Profilek irudikatzen dituzten faila-metakin erlazioen azterketak egitura tektoniko hauek duten jardueraren berri ematen du. Adibidez, 3. irudiko a profilak argi erakusten du faila sedimentu gazteenez estalita dagoela eta, beraz, azken urteetan jarduerarik ez duela izan. Aldiz, 3. irudiko b profilean failak azaleko sedimentu berri erresistiboenak ere zeharkatzen dituela ikusten da. Horrela, Granada arroko profiletatik interpreta daiteke Granada faila (3b. irudia) aktiboa dela gaur egun eta Alfacar faila aldiz, jada ez dela aktibo edo jarduera gutxiko etapa batean dagoela.

4. Ondorioak

Tomografia elektrikoa failak identifikatzeko erabil daiteke. Horrela, azalean ikusi eta interpreta daitezkeen egitura tektoniken sakonera txikiko jarraipena aztertu daiteke. Horretarako hainbat aukera daude: litologien interpretazioa, blokeen desplazamendua, metakinen morfologia eta IP datu altuen kokapena besteak beste.

Faila eta metakin gazteenen arteko erlazioak aztertuz egitura tektoniko aktiboak diren edo ez eztabaidatu daiteke. Horrela, jarduera sismikoa duten lurraldeen bilakaera aztertzeko tresna garrantzitsua da.

Erliebea antropikoki eraldatutako guneetan oso tresna baliagarria da, landa datuek eta datu geomorfologikoek failaren aktibitatearen berri ez dutelako ematen.

5. Etorkizunerako planteatzen den norabidea

Etorkizunerako hiru erronka nagusi jorratu daitezke tomografia elektrikoaren erabilerarekin, tektonika aktiboko lurraldeetan arrisku geologikoak aztertzerako orduan.

1) Lehenengo erronka 3D azterketak burutu ahal izatea izango litzateke. Badira lan batzuk non zenbait profil lerrokatuen bitartez, 3D-ko irudiak osatu diren. Profil bat osatzeko behar den denbora kontutan hartuz, bereizmen handiko profil-sarea osatzea oso lan astuna da eta denbora larregi eskatzen du oraingoz.
2) Teknika elektrikoen bitartez denborarekiko materialen propietate-aldaketak monitorizatzea. Horren adibide da Di Giussepe eta Troiano (2019)-k Pisciarelli fumarola-zelaian egindako lana. Hala ere, tektonika aktiboan ez dago lan esanguratsurik denbora kontuan hartzen duenik, eta failetan ematen diren jariakinen mugimenduak aztertzeko teknika erabilgarria izan liteke.
3) Tomografia elektrikoa beste zenbait teknika geofisikoekin batera analizatzea tektonika aktiboaren arloan. Tomografia elektrikoa konkretuki, erresistibitatea lantzen duten beste teknika elektriko (Berezko Potentziala, SP) zein elektro-magnetikoekin (Magnetotelurika, MT eta Audiomagnetolurika, AMT) batera landu daiteke (Martínez-Martos et al., 2017). Horrela, aztertutako egitura tektoniko aktiboa hainbat eskalatan aztertu ahal izango litzateke, teknika bakoitzaren bereizmen-maila desberdina delako.

6. Erreferentziak

Caputo, R., Piscitelli, S., Oliveto, A., Rizzo, E. eta Lapenna, V. (2003). The use of electrical resistivity tomographies in active tectonics: examples from the Tyrnavos Basin, Greece. *Journal of Geodynamics*, 36(1-2), 19-35.

Di Giuseppe, M. G. eta Troiano, A. (2019). Monitoring active fumaroles through time-lapse electrical resistivity tomograms: an application to the Pisciarelli fumarolic field (Campi Flegrei, Italy). *Journal of Volcanology and Geothermal Research*, 375, 32-42.

Galindo-Zaldívar, J., Ercilla, G., Estrada, F., Catalán, M., d'Acremont, E., Azzouz, O., eta Gil, A. J. (2018). Imaging the growth of recent faults: The case of 2016–2017 seismic sequence sea bottom deformation in the Alboran Sea (Western Mediterranean). *Tectonics*, 37(8), 2513-2530.

Galindo-Zaldívar, J., Gil, A. J., de Galdeano, C. S., Lacy, M. C., García-Armenteros, J. A., Ruano, P., … eta Alfaro, P. (2015). Active shallow extension in central and eastern Betic Cordillera from CGPS data. *Tectonophysics*, 663, 290-301.

Galindo-Zaldívar, J., Jabaloy, A., Serrano, I., Morales, J., González-Lodeiro, F. eta Torcal, F. (1999). Recent and present-day stresses in the Granada Basin (Betic Cordilleras): Example of a late Miocene-present-day extensional basin in a convergent plate boundary. *Tectonics*, 18(4), 686-702.

Guirado, E., Alcaraz-Segura, D., Rigol-Sánchez, J. P., Gisbert, J., Martínez-Moreno, F. J., Galindo-Zaldívar, J., González-Castillo, L. eta Cabello, J. (2018). Remote-sensing-derived fractures and shrub patterns to identify groundwater dependence. *Ecohydrology*, 11(6), e1933.

Keller, E. A. eta Pinter, N. (1996). *Active tectonics*. Upper Saddle River, NJ: Prentice Hall.

Kürçer, A., Chatzipetros, A., Tutkun, S. Z., Pavlides, S., Ateş, Ö. eta Valkaniotis, S. (2008). The Yenice–Gönen active fault (NW Turkey): Active tectonics and palaeoseismology. *Tectonophysics*, 453(1-4), 263-275.

Le Pichon, X., Francheteau, J. eta Bonnin, J. (2013). *Plate tectonics*. Elsevier.

Martínez-Martínez, J. M., Booth-Rea, G., Azañón, J. M. eta Torcal, F. (2006). Active transfer fault zone linking a segmented extensional system (Betics, southern Spain): Insight into heterogeneous extension driven by edge delamination. *Tectonophysics*, 422(1-4), 159-173.

Martínez-Martos, M., Galindo-Zaldivar, J., de Galdeano, C. S., Garcia-Tortosa, F. J., Martínez-Moreno, F. J., Ruano, P., González-Castillo, L. eta Azañón, J. M. (2017). Latest extension of the Laujar fault in a convergence setting (Sierra Nevada, Betic Cordillera). *Journal of Geodynamics*, 104, 15-26.

Martínez-Moreno, F. J., Delgado-Ramos, F., Galindo-Zaldívar, J., Martín-Rosales, W., López-Chicano, M. eta González-Castillo, L. (2018). Identification of leakage and potential areas for internal erosion combining ERT and IP techniques at the Negratín Dam left abutment (Granada, southern Spain). *Engineering Geology*, 240, 74-80.

Martínez-Moreno, F. J., Galindo-Zaldívar, J., Baena, C. L., González-Castillo, L., Herrera, J. B., Martínez-Martos, M., Del Rosal Padial, Y., Fernández Rodríguez, L. E., Tendero-Salmerón, V. eta Madarieta-Txurruka, A. (2021). Development and collapse of karstic cavities in folded marbles: Geomorphological and geophysical evidences in Nerja Cave (southern Spain). *Journal of Applied Geophysics*, 104287.

Morales, J., Serrano, I., Jabaloy, A., Galindo-Zaldivar, J., Zhao, D., Torcal, F. eta Lodeiro, F. G. (1999). Active continental subduction beneath the Betic Cordillera and the Alboran Sea. *Geology*, 27(8), 735-738.

National Research Council eta Geophysics Study Committee. (1986). *Active Tectonics: Impact on Society*. National Academies Press.

Papadopoulos, N. G., Yi, M. J., Kim, J. H., Tsourlos, P. eta Tsokas, G. N. (2010). Geophysical investigation of tumuli by means of surface 3D electrical resistivity tomography. *Journal of Applied Geophysics*, 70(3), 192-205.

Pedrera, A., Marín-Lechado, C., Stich, D., Ruiz-Constán, A., Galindo-Zaldívar, J., Rey-Moral, C. eta Mancilla, F. (2012). Nucleation, linkage and active propagation of a segmented Quaternary normal-dextral fault: the Loma del Viento fault (Campo de Dalías, Eastern Betic Cordillera, SE Spain). *Tectonophysics*, 522, 208-217.

Pedrera, A., Pérez-Peña, J. V., Galindo-Zaldívar, J., Azañón, J. M. eta Azor, A. (2009). Testing the sensitivity of geomorphic indices in areas of low-rate active folding (eastern Betic Cordillera, Spain). *Geomorphology*, 105(3-4), 218-231.

Pérez-Peña, J. V., Azor, A., Azañón, J. M. eta Keller, E. A. (2010). Active tectonics in the Sierra Nevada (Betic Cordillera, SE Spain): Insights from geomorphic indexes and drainage pattern analysis. *Geomorphology*, 119(1-2), 74-87.

Perrone, A., Lapenna, V. eta Piscitelli, S. (2014). Electrical resistivity tomography technique for landslide investigation: a review. *Earth-Science Reviews*, 135, 65-82.

Ruiz-Constán, A., Stich, D., Galindo-Zaldívar, J. eta Morales, J. (2009). Is the northwestern Betic Cordillera mountain front active in the context of the convergent Eurasia–Africa plate boundary?. *Terra Nova*, 21(5), 352-359.

Ruiz-Constán, A., Pedrera, A., Galindo-Zaldívar, J., Pous, J., Arzate, J., Roldán-García, F. J., ... eta Anahnah, F. (2012). Constraints on the frontal crustal structure of a continental collision from an integrated geophysical research: The central-western Betic Cordillera (SW Spain). *Geochemistry, Geophysics, Geosystems*, 13(8).

Sanz de Galdeano, C., Pelaez, M. J. eta Lopez, C. C. (2003). Seismic potential of the main active faults in the Granada Basin (southern Spain). *Pure and Applied Geophysics*, 160(8), 1537-1556.

Štěpančíková, P., Dohnal, J., Pánek, T., Łój, M., Smolková, V. eta Šilhán, K. (2011). The application of electrical resistivity tomography and gravimetric survey as useful tools in an active tectonics study of the Sudetic Marginal Fault (Bohemian Massif, central Europe). *Journal of Applied Geophysics*, 74(1), 69-80.

Sudha, K., Israil, M., Mittal, S. eta Rai, J. (2009). Soil characterization using electrical resistivity tomography and geotechnical investigations. *Journal of Applied Geophysics*, 67(1), 74-79.

Telford, W. M., Geldart, L. P. eta Sheriff, R. E. (1990). *Applied geophysics*. Cambridge university press.

Tendero-Salmerón, V., Galindo-Zaldivar, J., Peláez, J. A., Martínez-Martos, M., Henares, J., Marín-Lechado, C., Gil, A. J., eta López-Garrido, Á. C. (2020). Seismicity in Strike-Slip Foreland Faults (Central Betic Cordillera Front): Evidence of Indentation Tectonics. *Tectonics*, 39(7), e2020TC006143.

Weissl, M., Hintersberger, E., Lomax, J., Lüthgens, C. eta Decker, K. (2017). Active tectonics and geomorphology of the Gaenserndorf Terrace in the Central Vienna Basin (Austria). *Quaternary International*, 451, 209-222.

7. Eskerrak eta oharrak

Lan hau aurrera eramateko ezin-bestekoa izan da Elisa Segura Alonso eta Manuel Martinez Martosen laguntza landa lanetan. Gainera, lan hau Espainiako DAMAGE proiektuaren (CGL2016-80687-R AEI/FEDER) zein Andaluziako RNM-148 ikerketa taldearen diru-laguntzen ondorioz burutu izan ahal da. Lan honetan aztertu diren datuak Victor Tendero-Salmerón-en eta Asier Madarieta-Txurruka-ren doktoretza tesiaren parte dira. Lehenengoa, FPU deituriko Espainiako hezkuntza ministerioko diru laguntzari ezker ari da burutzen tesia eta bigarrena PTA laguntzaren (PTA2019-017685-I) bidez teknikari bezala ari da Granadako Unibertsitateko Geodinamika Sailean. Emaitza batzuk (2. irudia) aurretik publikatuak izan dira *Tectonics* aldizkarian (Tendero-Salmerón et al., 2020), “Seismicity in Strike-Slip Foreland Faults (Central Betic Cordillera Front): Evidence of Indentation Tectonics” izenarekin.

Biomolekulen elkarrekintzak eta fotofisika aztertzen laser espektroskopiaren bidez

Lamas,I.[1], Camiruaga,A.[1], Parra,M.[1], Usabiaga,I.[1], Montero,R.[2]
Kimika Fisika Saila, Zientzia eta Teknologia Fakultatea UPV/EHU[1]
SGIker Laser Laborategi Berezia UPV/EHU[2]
ander.camiruaga@ehu.eus

Laburpena

Bizitzarako ezinbestekoak diren molekulek fotoegonkortasun altua erakusten dute erradiazio UM xurgatu ostean. Zentzu honetan, eskuarki onartuta dago barne aldaketa ultraazkarra fotoegonkortasun maila altua izatearekin erlazionatuta dagoela, baina, era berean, prozesu honek harreman zuzena du konposatuaren egitura molekularrarekin, egitura-aldaketa txiki batek energia potentzial gainazalen topologia nabarmen aldatu dezake eta. Molekula hauen lasaikuntza azkarra kontrolatzen dituzten egitura faktoreak edota konposatuen artean eratzen diren elkarrekintzak zeintzuk diren zehazteko laser espektroskopia ezinbesteko teknika bilakatu da. Lan honetan, biomolekulen egitura zein dinamika gas-egoeran aztertzeko erabiltzen ohi diren bi tekniken berri emango da.

Hitz gakoak: Biomolekulak, espektroskopia, fotodinamika, elkarrekintza intermolekularrak, laserrak, gas-egoera

Abstract

The molecular building blocks of life exhibit a high degree of photostability after the absorption of UV radiation. In this sense, it is widely accepted that ultrafast internal conversion implies an enhanced photostability but this process ultimately linked to the molecular structure because subtle structural changes alter considerably the topology of potential energy surfaces. Aiming to unravel the key structural factors and the specificity of the interactions that control the rapid deactivation of these molecules, laser spectroscopic techniques have become an indispensable tool. Herein, two of the most extended techniques for studying the structure and photodynamics of isolated molecules are described.

Keywords: biomolecules, spectroscopy, photodynamics, intermolecular interactions, lasers, isolated phase

1. Sarrera eta motibazioa

Bizitzaren sorrera Lurrean zelan burutu zen zientzialariok erantzun nahi dugun galdera nagusienetariko bat da. Oro har onartuta dagoen hipotesiak eboluzio kimikoa sustatzen du, non biomolekula prebiotiko batzuk aitzindari gisa jokatu zuten gaur egungo nukleobase eta bizitzarako ezinbestekoak diren konposatuentzat (ikusi 1. irudia). Mundu prebiotikoan erradiazio ultramorearen (UM) maila askoz handiagoa zen gaur egun baino ozono-geruzarik ez baitzegoen. Hori dela eta, aitzindari prebiotikoak UM irradiazio baldintza bortitzak jasateko gai molekula aromatikoak direla suposatzen da(Kleinermanns et al., 2013; Rios eta Tor, 2013; Boldissar eta de Vries, 2018). Ondorioz, molekula hauek fotoegonkorrak izan behar ziren, hau da, xurgatutako energia modu eraginkor batean disipatzeko gai ziren, bere egitura molekularra kaltetu barik. Molekulek kitzikatuak izan ostean hau lortu dezakete lasaikuntza ez-erradiatiboen bidez. Izan ere, prozesu ez-erradiatiboen bizitza-denbora txikiek (pikosegundoetatik femtosegunduetara) molekularen osotasuna bermatzen dute, prozesu erradiatibo luzeek erreakzio fotokimiko eta ondorioz fotoprodukturen formakuntza sustatzen dutelako.

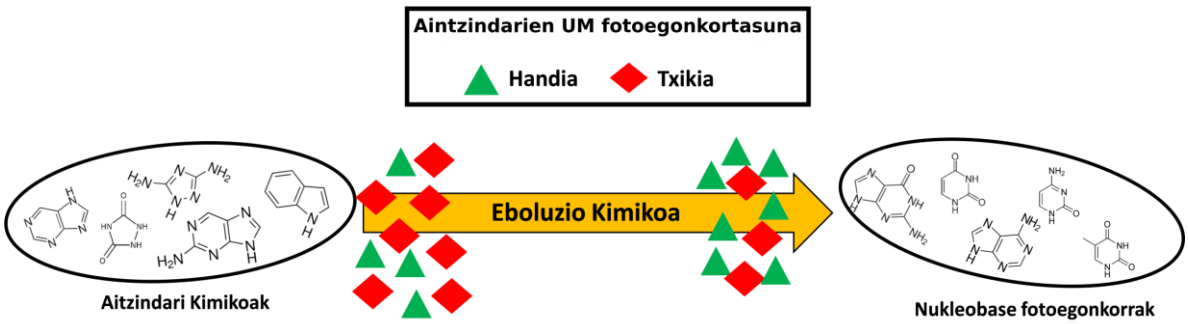
Azken hogei urteetan, ikerkuntza-talde esperimental eta konputazional ugari nukleobaseen eta beren deribatuen propietate fotofisikoak eta estrukturalak aztertzen egon dira (Crespo-Hernández et al., 2004; Improta et al., 2016). Orokorrean, konposatu hauek fluoreszentziako etekin kuantiko baxuak eta bizitza-denbora oso laburrak erakusten dituzte. Hori dela eta, oro har molekula hauen lasaikuntza mekanismoa kitzikatutako egoeratik funtsezko egoerara ematen den barne aldaketa (IC, ingeleseko *internal conversion*) ultraazkar baten bidez gertatzen dela onartu egin da. Dena den, egoera kitzikatuen energia potentzialen gainazalen (PES, *potential energy*

surface) topologiak, zeinek konposatuaren egitura molekularraren menpe dagoen, molekularen lasaikuntza prozesua zehazten du eta ondorioz molekulen fotoegonkortasuna mugatzen du. Horrexegatik, nukleobase eta deribatu edota tautomero batzuen arteko dinamika hain ezberdina da.

Propietate fotofisikoaz gain, DNA eta RNA molekuletan aurkitzen diren base nitrogenatuak elkarrekintza nahiko bereziak aurkezten dituzte. Izan ere, gaur egun ezagutzen dugun kodigo genetikoa molekula hauen arteko elkarrekintza espezifikoak direla eta osatzen da, non nukleobase bikoteen artean elkar ezagutzen diren. Mundu prebiotikoan nukleobaseen antzekoak ziren eta elkarrekintza berdinak sortu ahal zuten molekulak baldin bazeuden, zergatik soilik aurkitzen ditugu CGAT baseak kodigo genetikoan? Arlo honetan sakontzeko, eta prozesu biologikoetan oinarrizkoak diren elkarrekintza intermolekularren jakintzan sakontzeko, nukleobaseen antzekoak diren molekulen azterketa egiten da. Xantina familiaren kasua nahiko interesgarria da. Base purikoen egitura kimiko antzekoa izanda, timina eta adenina (AT) molekulen arteko elkarrekintza berdinak egiteko gaitasuna aurkezten dute. Gainera, gure gorputzean aurkitzen dira, guaninaren metabolismoan parte hartzen, eta nukleobaseen antzekotasuna dela eta, DNA eta RNA baseekin elkarrekintzak sortzeko ahalmena dute(Nemčeková et al., 2018; Zimmermann et al., 1997).

Zergatik Naturak molekula zehatz batzuk aukeratu ditu bizitzaren sorrerako? Funtsezko galdera honi erantzuteko, behetik-gorako hurbilketa (*bottom-up approach*) molekula hauen lasaikuntza azkarra kontrolatzen duten ezaugarri estrukturalak zeintzuk diren zehazteko baliagarria izan ez ezik, konplexuagoak eta biologikoki garrantzitsuagoak diren sistemak hobeto ulertzeko teknika egokia da. Azken batean, molekula bat zenbat eta handiagoa izan gero eta egoera kitzikatu gehiago aurkezten ditu, emaitza esperimentalen interpretazioa oztopatuz. Hau dela eta, errazagoa bilakatzen da eredu sinpleen propietateak ikertzea eta ostean, aldiro-aldiro, sistemaren konplexutasuna handitzea, ordezkatzaile taldeak edota disolbatzaile molekulak gehituz.

1. irudia. Aitzindari kimikoek pairatutako eboluzio kimikoa.



2. Arloko egoera eta ikerketaren helburuak

Lan honen helburua DNA eta RNA molekulak osatzen duten nukleobaseen egitura kimiko antzekoak dituzten molekulen propietateen ikerketa espektroskopikoa burutzea da. Alde batetik, mundu prebiotikoan zeuden baldintzei aurrera egiteko propietate fotofisikoen determinazioa; eta bestetik, bestelako molekulekin eratu dezaketen elkarrekintzen determinazio estrukturala. Horretarako, aipatutako bi propietateak determinatzeko, erabilitako metodologia esperimentalak deskribatuko dira.

2.1. Masan bereizgarria den laser espektroskopiaren oinarriak determinazio estrukturalerako

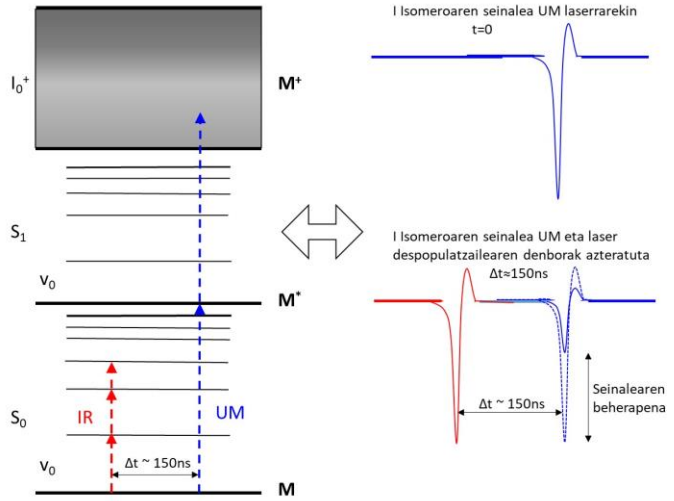
Espektroskopiak molekularen irudia edo espektroa ematen digu. Izan ere, espektroskopia ultramorea, molekularen kitzikapen maila elektronikoei buruzko informazioa ematen du, eta espektroskopia infragorria, aldiz, molekulen atomo-taldeen izaera eta haien arteko lotura-motak determinatzeko informazioa ematen du. Molekulen arteko elkarrekintzak ahalik eta hoberen aztertzeko, ingurumenarekin sortzen dituzten interakzioetatik isolatu beharra dago. Honi esker,

molekulen berezko propietate intrintsekoak aurkeztu egiten dira. Horretarako, espantsio supersonikoak erabiltzen dira, non molekulak edota molekula-bildumak eratu eta isolatu daitezke.

Espantsio hauetan lagina gas egoeran mantentzen da energia oso mugatuarekin, egoera kuantiko gutxi batzuk okupatuz. Baldintza horietan, lagin baten espektroa askoz sinplifikatua dago, esleipen zehatzago bat ahalbidetuz. Izan ere, baldintza hauetan edozein molekularen infragorri espektroa izanda, bere egitura isolatua eta egonkorrena determinatu daiteke.

Mota honetako espektroskopia infragorria erabiltzeko, espantsio supersonikoa masan bereizgarria diren laser teknika esperimentalekin konbinatu egiten da (Hollas, 2004; Lubman eta Kronick, 1982). Teknika horren izena Erresonantzia Bikoitzeko Ioi-Despopulazio Infragorri Espektroskopia (RIDIRS) da, zeinaren bitartez molekulen egituren arteko diskriminazioa ahalbidetzen du bibrazio-maiztasunak erabilita. Neurketarako, teknika honetan zuzenketa-metodo aktiboa erabiltzen da, laginaren seinalea erreferentzia gisa hartuta. Lagina laser lurrunketaren bitartez solidotik gasera pasatzen da. Ondoren balbula elektromagnetiko baten bidez (General Valve Series 9), hutsean dagoen hegaldi-denbora (TOF) masa espektrometrora bideratzen da, espantsio supersoniko bat sortuz.

2. irudia. RIDIRS teknikaren irudi eskematikoa.



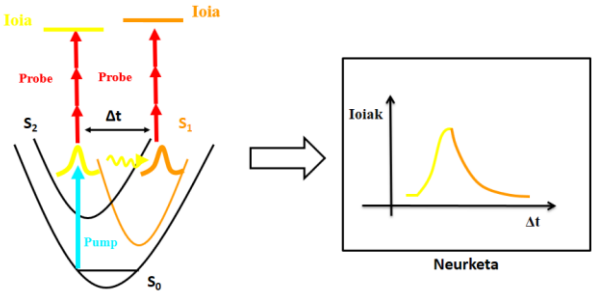
Aztertu nahi den molekulen edota konplexuen seinalea lortzeko ultra-morezko (UM) ionizazio laserra molekularen absortzio uhin-luzera batean finkatzen da, ioiak sortzeko absortzio multi-fotonikoaren bitartez (MPI). Laserrak 10 Hz-tan lan egiten du, eta tartekatuta bigarren infragorri (IR) laser bat erabiltzen da 5 Hz-tan. IR laserra UM-a baino 150 ns lehenago jotzen du lagina. Nola espantsio supersonikoan molekula gehienak oinarrizko bibrazio-mailetan aurkitzen diren, IR laserrak bibrazionalki kitzikatzen ditu molekulak. Gertakizun hau ionizazio laserra baino 150 ns lehenago gertatzen denez, UM-rezko laserrak lagina jotzean populazio kopuru baxuagoa aurkituko du, seinale txikiago bat emanez. Beraz, erreferentziazko seinalearen eta IR-ak seinalean eragindako aldaketen kenketa eginda, molekula edota konplexuen IR espektroa fase isolatuan lortzen da.

2.2. Fase isolatuan dauden molekulen dinamika: Denboran ebatzitako ionizazio espektroskopia

Molekulen lasaikuntza ultraazkarra behatzeko, ponpaketa-zunda teknikan oinarritutako metodo espektroskopikoak erabiltzen ohi dira (Antonov et al., 1978). Molekulak gas-egoera isolatuan aztertzeko oso zabalduta dagoen teknika espektroskopikoa denboran ebatzitako ionizazio multi-fotonikoa (TR-MPI, time-resolved multiphoton ionization) da. 3. irudian ikusi daitekeen moduan, teknika honetan, lehenengo eta behin, ponpaketa UM pultsu batek aztertu nahi den molekula kitzikatzen du nahi dugun energia-mailara. Ostean, sistemaren eboluzioa molekula bigarren infragorri (IR) pultsu baten bidez (zunda) ionizatuz jarraitzen da. Izan ere,

sortutako ioiak ponpaketa eta zunda pultsuen arteko denbora-atzerapenarekiko (Δt) aztertuz gero, hasieran prestaturiko kitzikatutako egoeraren lasaikuntza dinamika jarraitu daiteke. Aipagarria da ionizazio prozesua fotoi bat edo gehiago xurgatzearen ondorioz gerta daitekeela. Era berean, TOF espektrofotometro batean lan egiteak molekula nagusiaren eta sortutako espezien dinamika aztertzea baimentzen gaitu beraien masa-karga erlazioaren arabera.

3. irudia. Ponpaketa-zunda teknikaren irudi eskematikoa.



3. Ikerketaren muina

Atal honetan, aldez aurretik azaldutako teknika esperimentalak erabiliz lortutako emaitzak aurkezten dira.

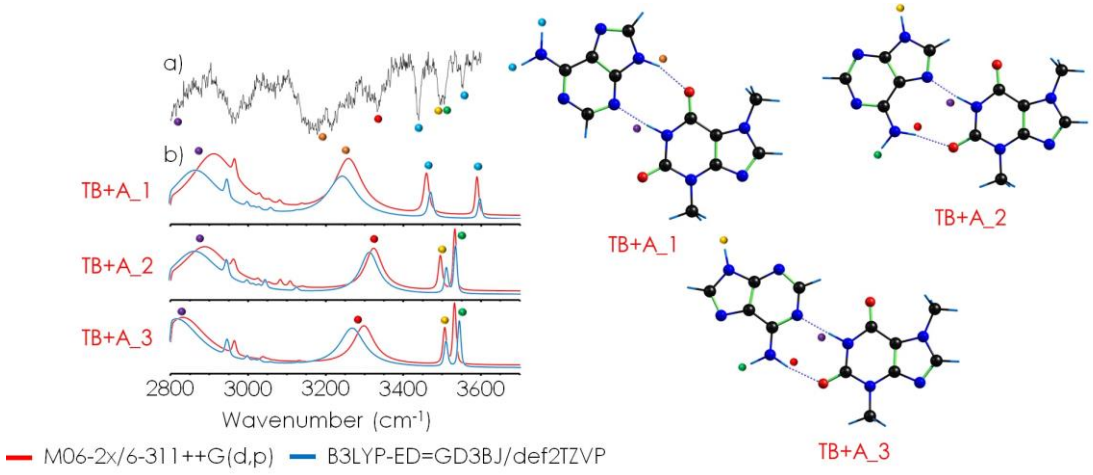
3.1. Teobromina eta Adeninaren arteko dimeroaren isolamendua eta karakterizazioa

Azken hamarkadetan, garrantzia handiko biomolekulen (aminoazidoak, azukreak, nukleobaseak, …) interakzioak modu sakonean ikertu egin dira fase isolatuan (Çarçabal et al., 2005). Bereziki interesgarriak dira DNA eta RNA nukleobaseen arteko konplexuen ikerketak, hauetan elkarrekintza espezifikoen propietateak guztiz isolatzen direlako. Ikerketa arlo horrekin erlazionatuta, xantina familiaren partaide bat, teobromina (TB), interes handia sustatzen du. Teobrominaren egitura base purikoaren berdina izanda, bere atomo-taldeak adenina eta timinaren artean ematen diren Watson-Crick hidrogeno loturak sortzeko gai da. Hori dela eta, teobromina eta adeninaren arteko konplexuan eratzen diren elkarrekintzak aztertu dira fase isolatuan, RIDIRS espektroskopiaren bidez.

Hala ere, teobromina eta adeninaren artean hainbat elkarrekintza sortu ahal dira. Lehenik eta behin, bi molekulen arteko konplexuaren bilaketa konformazional bat burutu da eratu dezaketen estruktura bilduma lortuz. Bilduma horretatik, egitura egonkorrenak aukeratzen dira kalkulu kuantikoen bitartez egitura optimizatzeko eta bibrazioen maiztasunak determinatzeko. Kalkulu horiek bi maila konputazional desberdinetan burutu dira (M06-2X/6-311++G(d,p) eta B3LYP/def2TZVP), bi metodoen arteko desberdintasunak konparatzeko. Eskuratutako egitura egonkorrenak 4. irudian irudikatu dira. Bibrazio-maiztasunen kalkuluei esker, bere IR espektro teorikoa eraiki da, esperimentalki lortutako datuekin konparatzeko.

4. irudian (a), IR espektro esperimentala irudikatu da adenina eta teobromina konplexuaren masan neurtuta. Antzeman daitekeenez, 3400-3600 cm^{-1} tartean zenbait banda estu agertzen dira, NH taldeei dagozkienak. Bestalde, bestelako absortzio zabalagoak daude, uhin-zenbaki baxuetara agertzen direnak. Absortzio horiek baita ere NH taldeen bibrazioei dagozkie. Baina hidrogeno lotura indar batean parte hartzearen ondorioz, bere oinarrizko bibraziotik desplazatuta agertzen dira. Hau jakinda, eta kalkuluei esker lortutako espektro teorikoarekin alderatuz, NH talde askeak eta lotuak identifikatzen dira, konplexuaren egitura esleituz. Esleitutako egituren absortzioak identifikatu egin dira (kolorezko bolatxoak), eta aurkeztutako egituren igarpenekin bat datoz. Teobromina eta adenina molekulak haien artean bi hidrogeno lotura indarren bitartez (NH···N eta NH···O motakoak) lotzen dira. Gainera, esperimentalki behatutako banda guztiak esleitzeko hiru egiturak beharrezkoak dira. Hortaz, adenina eta teobromina elkarrekintza modu egonkor bat baino gehiago dutela ondoriozta daiteke. Nahiko interesgarriak dira berez TB+A_2 eta TB+A_3 egiturak, DNA molekularen nukleobaseen arteko Hoogsteen eta Watson-Crick motako elkarrekintzen antzekoak direlako.

4. irudia. TB+A konplexuaren IR espektro esperimentala, kalkulu kuantikoetatik lortutako egitura egonkorrenen simulazioekin alderatuta.

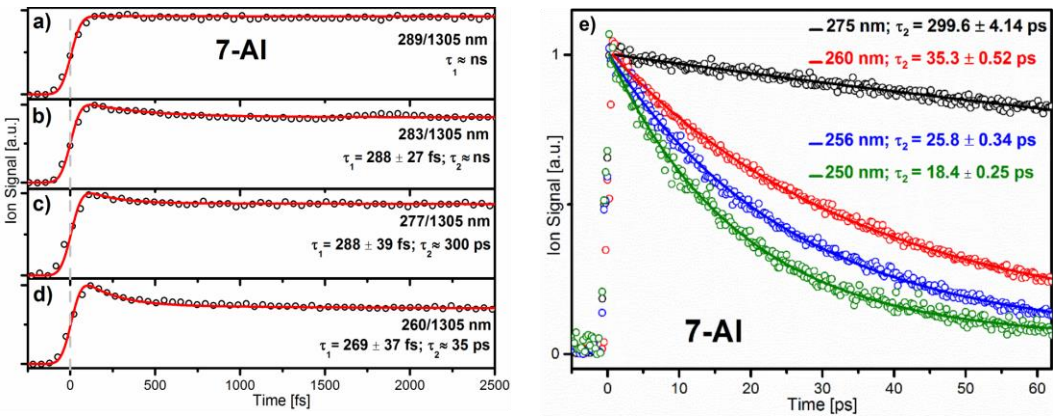


3.2. Bi egitura-isomeroen dinamika azterketa

Azken urteetan azaindol (AI) molekulen fotofisika eta fotokimika ikertzeak berebiziko garrantzia hartu du. Izan ere, DNA-ren base purinikoekin (adenina eta guanina) duten antzekotasuna dela eta, azaindolak biologikoki garrantzitsuak diren beste molekula konplexuagoen lasaikuntza mekanismoak hobeto ulertzeko eredu gisa har daitezke. Zentzu honetan, 7-AI nabarmen ikertu da bere dimeroak (7-AI_2) bi hidrogeno lotura baititu eta DNA-ren base pareak aztertzeko eredutzat hartu egin da (Douhal et al., 1989; Serrano-Andrés et al., 2001). Aldiz, beste egitura-isomeroen (4-AI, 5-AI eta 6-AI) egitura elektronikoa zein lasaikuntza dinamika orain arte ia ezezaguna zela esan daiteke. Atal honetan, 7-AI eta 6-AI-ren lasaikuntza mekanismoak gas-egoeran zeintzuk diren aztertu egin dira TR-MPI espektroskopiaren bidez.

5. irudian, 7-AI-ren lasaikuntza prozesua aztertu dezakegu kitzikapen energia handituz gero, 289 nm-tik 250 nm-ra arte. Denbora-motzeko (5.a-d irudiak) eta luzeko (5.e irudia) neurketak burutu ziren. Lehenengo motako neurketak 1305 nm-ko zunda uhin-luzerarekin burutu ziren eta $\tau_1 \approx 280$ fs-ko bizitza-denbora ikustea baimendu zuten, askoz luzeagoa den beste denbora-konstante (τ_2) batekin batera. Motelagoa den τ_2-ren balioa zehazteko denbora-luzeko neurketak burutu ziren. Hauen arabera, τ_2 gero eta txikiagoa da kitzikapen energia handitzerakoan, 300 ps-tik 18 ps-ra bizkortzen baita uhin luzera 275 nm-tik 250 nm-ra aldatzerakoan.

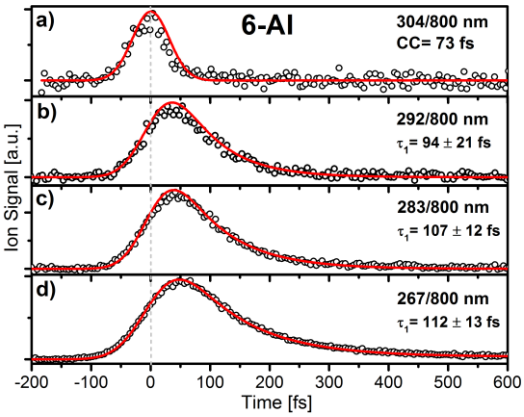
5. irudia. 7-AI-ren neurketak kitzikapena 289 (a), 283 (b), 277 (c) eta 260 nm-rekin (d) burutzerakoan, zunda uhin-luzera 1305 nm izanda. Denbora-luzeko neurketetan (e), aldiz, 800 nm zunda erabili da.



Bestalde, 6. irudian 6-AI-ren lasaikuntza prozesua aztertu dezakegu kitzikapen energia handituz gero. 6.a-n sistemaren erantzun instrumentala ikusi dezakegu, molekularen ionizazio

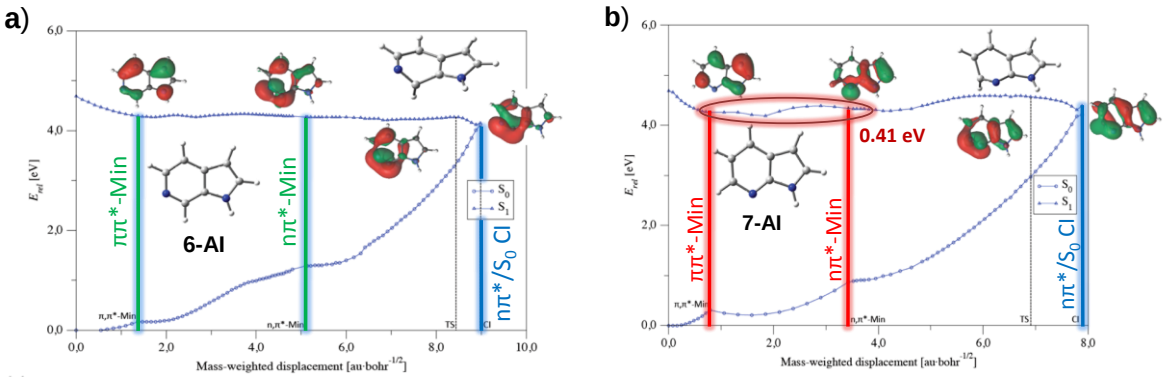
ez-erresonante bati dagokion neurketa baita. Ostera, 6.b, c eta d irudietan, eskuratutako datu esperimentalak $\tau \approx 100$ fs-ko esponentzial batekin modela daitezke. Bizitza-denbora honek prestaturiko egoera kitzikatuaren barne aldaketa oinarrizko egoerara deskribatzen du.

6. irudia. 6-AI-ren neurketak kitzikapena 304 (a), 292 (b), 283 (c) eta 267 nm-ko (d) uhin-luzerekin burutzerakoan, zunda uhin-luzera 800 nm izanda.



Beraz, argi dago 6-AI-ren lasaikuntza prozesua oinarrizko egoerara 7-AI-rena baino askoz bizkorragoa dela, azken honentzat ns-ps-etako denbora-eskalan gertatzen baita. Ezberdintasun nabarmen honen arrazoia nagusia zein den ezagutzeko MS-CASPT2//TD-DFT kalkuluak burutu ziren isomero bakoitzaren energia minimoko bidea (MEP, ingeleseko *minimum energy pathway*) zein den ezagutzeko (ikusi 7. irudia). Buruturiko kalkuluen arabera nπ* egoera kitzikatuak ezinbesteko garrantzia du molekula hauetan. Izan ere, 6-AI-an lasaikuntza prozesua nπ* egoeratik ematen da. Aldiz, 7-AI-an ~0.41 eV-ko energia hesi batek populazioa nπ* egoeratik igarotzea galarazten du eta ondorioz, bere erlaxazio prozesua askoz luzeagoa izatera behartzen du. Gauzak horrela, ondorio gisa esan daiteke AI-etan 6-atomoetako eraztuneko nitrogeno atomoaren posizioak konposatuen fotofisikan eragin zuzena duela frogatu egin dela. Izan ere, molekularen dinamika ππ* eta nπ* egoeren arteko energiaren menpe dago.

7. irudia. 6-AI (a) eta 7-AI-ren (b) energia minimoko bideak. 7-AI-ren kasuan 0.41 eV-ko hesi batek ππ* eta nπ* kitzikatutako egoeren arteko akoplamendua eragozten du.



4. Ondorioak

Bizitzarako ezinbestekoak diren molekulen lasaikuntza mekanismoak beraien egitura molekularraren menpe daude. Lan honetan RIDIRS eta TR-MPI tekniken baliagarritasuna biologikoki garrantzitsuak diren konposatuen ezaugarri fotofisikoak eta estrukturalak aztertzeko erakutsi da. Azaldutako lehenengo adibidean, RIDIRS teknikak oso antzekoak eta egonkorrak diren teobromina-adenina klusterren hiru egitura molekularrak ezberdintzea ahalbidetu du, euren hatz-markak eskuratuz. Aldiz, bigarren kasuan, TR-MPI metodoak azaindolen familiako bi egitura-isomeroen lasaikuntza prozesua ezberdintzea baimendu du. Bi teknika espektroskopiko hauek osagarriak direla esan daiteke, molekula biologikoek jokatzen duten rola

zein den guztiz ezagutzeko, konposatuek pairatzen dituzten elkarrekintza espezifikoak zeintzuk diren ezagutzea beharrezkoa baita.

5. Etorkizunerako planteatzen den norabidea

Gas-egoeran burututako esperimentuak bidai luze baten lehenengo urratsak dira. Nukleobaseen benetako jokaera ingurumen oso konplexuetan gertatzen da. Izan ere, makroegituren eraketak zein disolbatzailearen eraginak konposatuen dinamika nabarmen aldatzen du, elkarrekintza espezifiko ugarien ondorioz. Hori dela eta, molekulen jokaera egoera isolatuan aldez aurretik ondo ulertzea ezinbestekoa da, sistemaren konplexutasuna sistematikoki handituz. Esandakoa erakutsitako adibideetara eramaten badugu, interesgarria izango litzateke disolbatzaile polarrek azaindolen lasaikuntza dinamikaren aldaketan duten eragina behatzea. Era berean, nukleobaseen antzeko egiturei buruzko ikerketa aurrera eraman daiteke tamaina handiagoko konplexuen egiturak esleitzeko, hala nola, nukleotidoen (base nitrogenatua + desoxirribosa) arteko elkarrekintzak aztertzeko. Orohar, konplexutasun handiagoko sistemen ikerketa fase isolatuan bere propietate intrintsekoak erakusteko aukera emango litzateke.

6. Erreferentziak

Antonov, V. S., Knyazev, I. N., Letokhov, V. S., Matiuk, V. M., Movshev, V.G., Potapov, V.K., (1978), "Stepwise laser photoionization of molecules in a mass spectrometer: a new method for probing and detection of polyatomic molecules", *Optics Letters*, 2, 37-39.

Boldissar, S. eta de Vries, M. S., (2018). "How nature convers its bases", *Phys.Chem.Chem.Phys.*, 20, 9701-9716.

Çarçabal, P., Jockusch, R., Hünig, I., Snoek, L., Kroemer, R. T., Davis, B. G., Gamblin, D., Compagnon, I., Oomens, J., Simons, J. P., (2005), "Hydrogen Bonding and Cooperativity in Isolated and Hydrated Sugars: Mannose, Galactose, Glucose, and Lactose", *J. Am. Chem. Soc*., 127, 32, 11414-11425.

Crespo-Hernández, C., Cohen, B., Hare, P. M., Kohler, B., (2004), "Ultrafast Excited-State Dynamics in Nucleic Acids", *Chem. Rev.*, 104, 1977-2020.

Douhal, A., Kim, S. K., Zewail, A. H., (1989), "Femtosecond molecular dynamics of tautomerization in model base pairs", *Nature*, 378, 260-263.

Hollas, J., (2004), *Modern Spectroscopy*, 4th Edition, John Wiley & Sons Ltd, West Sussex, England.

Improta, R., Santoro, F. Blancafort, L., (2016), "Quantum Mechanical Studies on the Photophysics and the Photochemistry of Nucleic Acids and Nucleobases", *Chem. Rev.*, 116, 3540-3593.

Kleinermanns, K., Nachtigallová, D., de Vries, M. S., (2013), "Excited state dynamics of DNA bases", *Int. Rev. Phys. Chem.*, 32, 308-342.

Lubman, D. M. eta Kronick, M. N., (1982), "Mass spectrometry of aromatic molecules with resonance-enhanced multiphoton ionization", *Anal. Chem*., 54, 5, 660-665.

Nemčeková, K., Labuda, J., Milata, V., Blaškovičová, J., Sochr, J., (2018), "Interaction of DNA and mononucleotides with theophylline investigated using electrochemical biosensors and biosensing", *Bioelechem*., 123, 182-189.

Rios, A. C., eta Tor, Y., (2013), "On the Origin of the Canonical Nucleobases: An Assessment of Selection Pressures across Chemical and Early Biological Evolution", *Isr. J. Chem*., 53, 469-483.

Serrano-Andrés, L., Merchán, M., Borin, A. C., Stalring, J., (2001), "Theoretical studies on the spectroscopy of the 7-azaindole monomer and dimer", *International Journal of Quantum Chemistry*, 84, 181-191.

Zimmermann, G. R., Jenison, R. D., Wick, C. L., Simorre, J., Pardi, A., (1997), “Interlocking structural motifs mediate molecular discrimination by a theophylline-binding RNA”, *Natural Structural Biology*, 4, 644-649.

7. Eskerrak eta oharrak

Burututako esperimentuak Espainiako MINECO-k emandako diru-laguntzari (CTQ2015-68148-C2-1-P proiektua) esker gauzatu dira. Era berean, I.L. eta M.P.-ak UPV/EHUri eskertzen diote bere doktoregai beka. A.C.-k Eusko Jaurlaritzari eskertzen dio bere doktoregai beka. Eskerrak ere UPV/EHUko SGIker Laser zerbitzuari, hor gauzatu baitira 3.2. ataleko neurketa esperimentalak eta Lluís Blancafort-i (Universitat de Girona) azaindolentzat egindako kalkulu konputazionalengatik.

Sulfonamida antibiotikoen determinazioa zoruan

Martín, S.[1], Mijangos, L. [1,2], Etxebarria, N.[1,2], Prieto, A. [1,2], Olivares, M.[1,2], Zuloaga, O.[1,2]

[1]*Kimika analitikoa saila, Zientzia eta Teknologia fakultatea, Euskal Herriko Unibertsitatea, (EHU/UPV), PK. 644, 48080 Bilbao*

[2]*Plentziako itsas estazioa, (PIE), Zientzia eta teknologia fakultatea, (EHU/UPV), P.K. 47, 48620 Plentzia*

leire.mijangos@ehu.eus

Laburpena

Lan honetan konpostarekin ongarritutako zoruetan sulfonamida antibiotikoak (sulfadiazina, sulfametazina, sulfapiridina, sulfatiazola eta sulfametoxazola) determinatzeko metodo analitiko baten optimizazio burutu da, erauzketa solido-likidorako ultrasoinu fokatua eta solido-likido erauzketa garbiketa erabiliz. Erauzketa kuantitatiboa lortzeko, erauzketa urratseko disolbatzailearen izaera eta garbiketa urratseko eluzio profila aztertu dira. Metodo analitikoa bi mailetan berretsi da (50 ng/g eta 150 ng/g) eta lortutako berreskurapen zuzenduek (% 75-107) metodoaren zehaztasuna bermatzen dute. Metodoaren kuantifikazio mugak kalkulatu ostean (<4.6 ng/g), Neikerrek hornitutatako lurra:konpost nahastea analizatzeko erabili da.

Hitz gakoak: Antibiotikoak, zorua, FUSLE, SPE,

Abstract

The present study is focused on the development of an analytical method based on focused ultrasonic solid-liquid extraction followed by a solid-phase extraction clean-up for the simultaneous analysis of certain sulfonamide antibiotics (sulfadiazine, sulfametazine, sulfapiridine, sulfatazole, sulfametoxazole) in soil. Different variables affecting the extraction (solvent nature) and the clean-up step (elution profile) were optimized in order to improve the sensitivity of the separation and detection steps. Exhaustively and precision in terms of apparent recovery and relative standard deviation (RSDs %) of the method were determined and values 75-107 % and > 20 % were obtained, respectively. Method detection limits below 4.6 ng/g were obtained and the developed methodology was applied to the analysis of soil purchased by NEIKER.

Keywords: antibiotics, soil, FUSLE, SPE

1. Sarrera eta motibazioa

Azken urteotan, zenbait ikerketek eta ingurumenari buruzko legediek euren arreta lehentasunezko substantzietan jarri dute, kutsatzaile organiko iraunkorrak gailenduz. Azken horiek nonahikotasun eta iraunkortasun nabarmena aurkezten dute, eta toxikotasun altua izateaz gain, kasu batzuetan, kartzinogenoak izan daitezke. Kutsatzaile horiez gain, badaude nahiko arriskutsuak diren beste kutsatzaile batzuk emergente izenarekin ezagutzen direnak. Azken horiek ingurumenean behatu diren arren, ez daude ohiko kontrol ezta monitorizazio-programen barnean (Lorenzo et al., 2013). Kutsatzaile organiko emergenteak, funtsean, ingurumenean sar daitezkeen eta, horren ondorioz, giza osasunerako edo ekosistemarako ondorio kaltegarriak eragin ditzaketen substantzia naturalak edo sintetikoak dira (De la Cruz et al., 2012).

Hamarkadetan zehar, nekazaritza, industria eta medikuntza arloetarako sintetizatutako biologikoki aktiboak diren substantzien tonak ingurumenera isuri dira, konposatu horiek ingurumenean izan

ditzaketen ondorioei erreparatu gabe. Beraz, giza aktibitatearen ondorioz, hainbat kutsatzaile heldu dira ingurumenera, eta horietako batzuk (lehentasunezkoak) legislatu diren arren, beste batzuk ez dira oraindik legislatu (emergenteak) (Lorenzo et al., 2013**)**. Kutsatzaile emergenteen artean, batez ere, eguneroko bizitzan kantitate handietan erabiltzen diren produktuak sartzen dira, hala nola, gizakientzako eta albaitaritzako farmaziako produktuak, norberaren zaintzarako produktuak, tentsioaktiboak eta tentsioaktiboen hondakinak, plastifikatzaileak eta hainbat gehigarri industrial (Petrovic, 2003). Talde horren barruan kezkagarrienetarikoak antibiotikoak dira, azken horien isurpenak ingurumenean bakterio erresistenteen agerpena areagotu ditzake eta (Petrovic, 2003).

Antibiotikoak mikroorganismoek sortutako substantzia kimikoak dira, zeintzuk beste mikroorganismoen hazkundea suntsitzen edo inhibitzen duten. Egun, sulfonamida gizakien eta abereen gaixotasunak saihesteko eta tratatzeko antibiotiko-familia erabilienetarikoa da (Cheng et al., 2020).

Sulfonamiden % 30-90 inguru ingurumenera askatzen dira farmako aktibo edo metabolito primario gisa, antibiotiko horrekin trataturiko animalien gorozkien bidez. Lurzoruan hautemandako sulfonamiden kontzentrazioa µg/kg eta mg/kg artekoa da, eta hori lurzorua aldatzeko ongarri organiko gisa erabiltzen diren sulfonamidaz kutsatutako lohiak, ongarriak eta hondakin-urak erabiltzearen ondorioa da (Cheng et al., 2020). Antibiotikoekiko erresistentzia kezka handia da osasun publikorako eta nekazaritzarako ongarri organikoen (simaurra) erabilera handiak arazo hori areagotzen du. Izan ere, ongarri organikoek antibiotikoen eta erresistentzia geneen gordailu gisa jarduten dutela ikusi da eta, horren ondorioz, hainbat erresistentzia-gene aurkitu dira ongarri horiekin ongarritutako laboreetan (tomate edo azenarioetan) (Cheng et al., 2017).

1.1. Antibiotikoen analisia zoruan

Ingurumenean dauden hondakin farmazeutikoen presentzia eta helmuga ebaluatzeko, aztarna-mailan (normalean ng/g edo µg/g tartean) aldi berean konposatu ugari analizatzeko metodo analitikoak beharrezkoak dira. Antibiotikoak dituzten ingurumen-matrize solidoak, hau da, lurzoruak, lohiak eta sedimentuak, gutxi ikertu dira urarekin alderatuta. Matrize solidoen analisiaren konplexutasuna izan daiteke horren arrazoi, laginean dauden interferentziak ezabatzeko, erauzteko eta garbitzeko prozedura sakonak behar dira eta (Díaz-Cruz et al., 2006).

Egun, antibiotikoen analisirako erauzketa-metodo gehienak irabiaketa mekanikoan edo ultrasoinuan oinarritzen dira. Ultrasoinuen artean, ultrasoinu-bainua eta erauzketa solido-likidorako ultrasoinu fokatua (FUSLE, *Focused ultrasound solid liquid extraction* delakoa) da gehien erabiltzen dena. Izan ere metodo honekin lortutako emaitzak irabiaketa mekanikoarekin lortutakoa baino 100 aldiz hobeagoa da, errepikakortasun hobea, eraginkortasun altuagoa eta erauzketa azkarragoa erakutsi du (Luque-García et al., 2003, Seide et al., 2012).

Matrize solidoen konplexutasunagatik, erauzketa egin ostean erauziak garbitu egin behar dira egon daitezkeen interferentziak eliminatzeko. Horretarako, gehien erabiltzen den teknika fase solidoaren erauzketa (SPE, *solid phase extraction*). Beraien artean, Oasis HLB-a (oreka hidrofiliko-lipofilikoa) ingurumen solidoetan dauden antibiotikoen garbiketarako gehien erabiltzen den kartutxo mota da (Bian et al., 2015, García-Galán et al., 2013, Tetzner et al., 2016).

Antibiotikoen analisiari dagokionez, likido-kromatografia tandem masa-espektrometriari akoplatuta (LC-MS/MS) da egun eskuragarri dagoen teknikarik eraginkorrenetarikoa analisi kuantitatiborako (Gismera et al., 2009).

2. Arloko egoera eta ikerketaren helburuak

Jatorrizko lohiek antibiotikoen eta antibiotikoen erresistentziaren hedapenean izan dezaketen eragina aztertzea garrantzitsua da. Zentzu honetan, lan honen helburu nagusia metodo analitiko bat garatzea eta berrestea da konpostarekin ongarritutako zoruetan sulfonamida antibiotikoak

determinatzeko, konkretuki, sulfadiazina, sulfametazina, sulfapiridina, sulfatiazola eta sulfametoxazola antibiotikoak.

Helburu nagusi hori lortzeko HPLC-MS/MS-aren bidezko analisiaren optimizazioa egiteaz gain, FUSLE-aren bidez egindako erauzketa eta SPE-aren bidez egindako garbiketa urratsen optimizazioa egiten da, konposatuak modu kuantitatiboan berreskuratzeko matrize-efektu minimoarekin. Metodo analitikoa berretsi ondoren, sulfametazina antibiotikoa kontzentrazio ezberdina duten konpostarekin ongarritutako zoruen analisia egiten da.

3. Ikerketaren muina

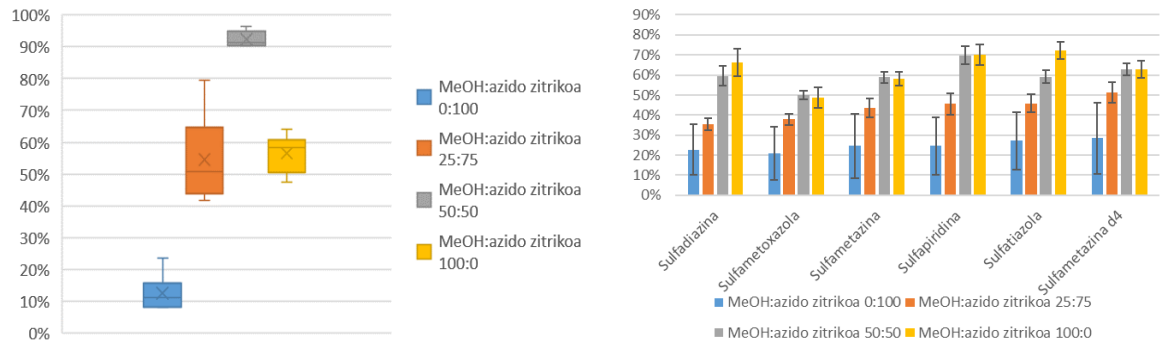
3.1. Metodoaren optimizazioa

Lan honetan erabilitako antibiotikoak sulfadiazina, sulfametazina, sulfapiridina, sulfatiazola eta sulfametoxazola dira. Sulfonamiden determinaziorako metodoaren garapenean hainbat urratsen optimizazioa aztertu da, horien artean, FUSLE-aren bidez egindako erauzketan erauzlearen natura eta SPE-aren bidez egindako garbiketa urratsen eluzio profila. Bibliografian dauden lanetan oinarrituta (Bian et al., 2015; García-Galán et al., 2013; Tetzner et al., 2016) Oasis HLB kartutxoak erabili dira SPE bidezko garbiketarako.

Optimizazio urrats hauetarako, sulfonamida gabeko 0,5 g zoru:konpost nahaste liofilizatua erabili da eta antibiotiko guztiak (trazagarria barne) 2 µg/g kontzentrazioko stock disoluzioarekin dopatu dira, azken erauzian 300 ng/g kontzentrazioa izateko. Gainera FUSLE-aren baldintzak honakoak izan dira: erauziaren 7 mL erabili dira, % 20-ko anplitudea eta 2 minutuko erauzketa (0,8 s martxan eta 0,2 s etenik erauzketa minutuko).

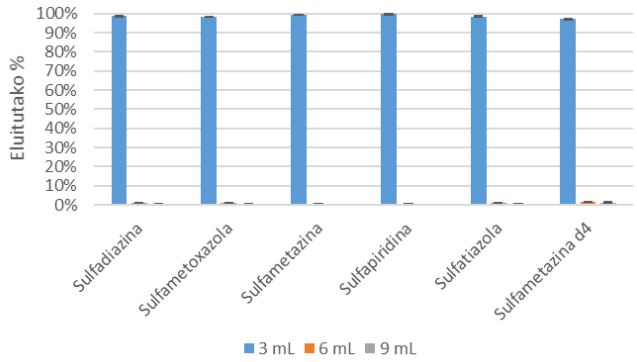
Lehenik, zoruan aztertu nahi diren analitoen erauzketa kuantitatiboa izateko hurengot disolbatzaile nahaste ezberdin aztertu dira: metanol:azido zitriko (0:100), (25:75), (50:50), eta (100:0) nahasteak. Erauzketaren baldintza optimoak aurkitzeko bi erantzun hartu dira kontuan. Alde batetik, analitoen berreskurapena maximoa izatea eta, bestetik, aukeratutako erauzlearekin lortutako erauzia garbitu ostean detekzioan dagoen matrize-efektua txikiena izatea. Erauzketa baino arinago dopatutako esperimentuetan lortutako etekinak erauzketa ostekoekiko normalizatu dira eta *box-whiskers* grafiko moduan adierazi dira 1 irudian (ezkerra). 1 Irudian (eskuina), aldiz, garbiketa-urratsaren ostean dopatutako laginetan lortu diren etekinak bildu dira, hau da, matrize efektua (% 100-etik gehien aldentzen diren esperimentuetan matrize-efektu sendoagoa dugula esan daiteke). Ikus daitekeen moduan, metanol:azido zitriko (50:50) nahastearekin emaitza onenak lortu dira, analitoen berreskurapen handiena eta, orohar, matrize-efektu txikiena lortzen direlako antibiotiko gehienentzako.

1. irudia. Erauzketaren baldintza optimoak aurkitzeko aztertu diren erantzunak. Ezkerra, erauzketa baino arinago dopatutako esperimentuetan lortutako etekinak erauzketa ostekoekiko normalizatuta. Eskuina, garbiketa-urratsaren ostean lortutako matrize efektua (%).



SPE-ren eluzio-profilari dagokionez, hiru bolumen (3 mL, 6 mL eta 9 mL) ezberdin aztertu dira garbiketa-urratsean analitoen berreskurapen kuantitatiboa lortzeko, eluzio-disolbatzaile gisa matanola erabilita. Hiru bolumen horiek jarraian gehitu dira saio-hodi desberdinetan bilduz, bakoitzean berreskuratutako etekina lortzeko. Esperimentua hiru aldiz errepikatu da. 2. irudian bolumen bakoitzean lortutako etekin normalizatuak bildu dira eta, ikus daitekeen moduan, 3 mL eluitzaile jasotzea nahikoa da analito guztiak kuantitatiboki eluitzeko, 6 eta 9 mL gehitzerakoan % 1a baino gutxiago berreskuratzen baita. Ondorioz, konposatuak 3 mL metanolarekin eluituko dira hurrengo esperimentuetan.

***2*. irudia Eluzio-profilaren optimizazioan lortutako etekin normalizatuak.**



3.2. Metodoaren berrespena

Metodoa beeresteko kuantifikazio-mugak (KM) eta berreskurapen absolutuak eta zuzenduak aztertu dira lortutako baldintza optimoetan. KM instrumentalak ($KM_{instrumental}$-ak) 4,6 ng/g baino txikiagoak dira, eta prozeduralak ($KM_{prozedural}$-ak), aldiz, 4,5 ng/g baino txikiagoak. Lortu diren mugak bibliografiakoak (20-100 ng/g artekoak) baino hobeak dira (Nieto et al., 2007). Berreskurapenei dagokienez, maila baxuan (50 ng/g) zein altuan (150 ng/g) lortutako etekin absolutuak % 48-69 bitartean daude. Trazagarriarekin zuzendu ostean, aldiz, maila bietako balioak % 75-107 tartera igaro dira. Hori dela eta, emaitza xeheak direla esan daiteke. Bestalde, desbideratze estandar erlatiboa (DEE) dagokionez % 0.4-20 tartekoa izan da bi mailetan, proposatutako metodoan lortutako emaitzak doiak izanik.

.

3.3. Lagin errealak

Azken pausua lagin errealen kontzentrazioa determinatzea izan da eta, horretarako, Neikerrek lurra:konpost nahasteak hornitu ditu euren analisirako. Nahaste horietan sulfametazinarekin dopatuta egon da bi kontzentrazio ezberdinetan. Horietako bi 100 g/g kontzentrazioan dopatu dira hilabete bateko aldearekin eta beste biak, modu berean baina 1000 µg/g kontzentrazioan dopatu dira. Lurra:konpost nahasteen 0,5 g erabili dira aipatutako metodo analitikoarekin analisatzeko.

Lortutako kontzentrazioak espero zirenen kontzentrazioen % 1 baino ez dira T0 (1,5 ± 0,5 µg/g eta 12 ± 4 µg/g maila baxuan eta altuan, urrenez urren) eta T1 laginetan (2,4 ± 0,9 eta 0,6 ± 0,2 µg/g maila baxuan eta altuan, urrenez urren). Lagin errealetan determinatutako sulfametazina kontzentrazio baxuak, denboraren ondorioz gertatutako degradazioaren ondorioa izan daiteke. Izan ere, hilabete bat igaro ondoren (T1) 1000 µg/g sulfametazinarekin dopatutako laginek T0 laginek baino kontzentrazio askoz baxuagoa dutela. T1-ean degradazioa hilabetean zehar gertatu izana adieraz dezake. T0 laginetan ordea, laginen biltegiratzean egon daiteke arazoa, izan ere, laginak jaso eta liofilizatu gabe biltegiratu baitira. Laginen lehortzea airetan egin zen, eta zoruan geratzen den ura izan daiteke T0 laginetan behatutako degradazioaren erantzule

Behatutako kontzentrazio galera hau, sulfametazinaren degradazioagaitik izan daitekeen aztertzeko saiakera bat egin da. Horretarako, dopatu gabeko konpost:zorua hezea 2 µg/g kontzentrazioan dopatu da eta denbora ezberdinetan analisatu dira. Degradazioaren azterketarako, lagin batzuk dopatu nd, ilunpetan eta hozkailuan gorde dira eta aste bat igaro (T1 aste) ondoren aztertu dira optimizatutako metodo analitikoa erabilita. Degradazioa ematen den erkatzeko, beste lagin batzuk dopatu eta ordu erdira (T0) aztertu dira metodo analitiko berdinarekin astebete biltegiratuta egon diren laginekin batera. Hiru erreplika egin dira baldintza bakoitzeko.

Laginak ilunpetan eta hozkailuan gorde diren arren, lagin hezeetan sulfametazinaren degradazioa eman da aste bateko epean % 55-77 arteko galerak gertatzen baitdira sulfonamida antibiotikoetan. Honek aditzera ematen du, zentzuzkoa dela aurreko frogetan % 1-a baino ez berreskuratzea. Hala ere, analisi eta froga gehiago egin beharko zitezkeen sulfametazina zein degradazio produktuetara degradatu den aztertzeko edota degradazioaren faktoreak zeintzuk zitezkeen behatzeko.

4. Ondorioak

Lan honetan sulfonamida antibiotikoak zoru:konpost nahastean traza mailan (ng/g) determinatzeko metodo analitiko zehatza garatu da. Emaitza egokiak lortzeko, hots, etekin egoki eta matrize efektua minimoa izateko, berariazkoa izan da erauzle optimoa bilatzeaz gain, garbiketa urrats eraginkorra izatea. Honela, disolbatzaile organiko edo disolbatzaile urtsu puruak erabili beharrean, metanol:azido zitriko (0,2 M pH=4,5) nahasteak erabiltzea beharrezkoa izan da sulfonamiden etekin handienak lortzeko erauzketan. Garbiketa urratsari dagokionez, urrats hau eraginkorra izan da Oasis HLB-ko kartutxoak erabilita eta laginak ur portzentai handian kargatuta. Trazagarriaren erabilerak kanpo kalibrazioaren erabilera bermatu du, eta astunagoak diren adizio estandarrak edo matrizeari egokitutako kalibratuak ekidin ahal izan dira. Honela garatutako metodo analitikoak egiazko emaitzak (% 76 - % 106) eskaintzen ditu kontzentrazio maila baxu (50 ng/g) zein altuan (150 ng/g), errepikakortasun handiarekin eta detekzio muga baxuekin (< 5 ng/g).

Kontzentrazio ezberdinetan dopatutako eta zaharkitutako zoru:konpost laginak aztertu ondoren, lan honetan behatu ahal izan da sulfametazinaren degradazioa azkar gertatzen dela eta horrek kalteak murriztu ditzake. Aste batean % 55-77 artekoak eta hilabete batean ia % 99-ko galerak ikusi dira, kontzentrazioaren menpe ez egonik.

5. Etorkizunerako planteatzen den norabidea

Antibiotikoen degradazio maila azkarra dela eta, interesgarria izango zitekeen, hurrengo lanetan sulfametazinaren degradazio-produktuak zeintzuk diren aztertzea eta horiek benetako laginetan monitorizatzea, batzuetan jatorrizko konposatuak baino kaltegarriagoak izan daitezke eta. Horretarako, bereizmen altuko masa espektrometria erabiltzea beharrezkoa da, konposatu ezezagunen identifikazio unibokoa bermatzeko.

6. Erreferentziak

Bian, K.; Liu, Y.; Wang, Z.; Zhou, T.; Song, X.; Zhang, F.; He, L. (2015) Determination of Multi-Class Antimicrobial Residues in Soil by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. RSC Adv 5 (35), 27584–27593.

Chen, Q.-L.; An, X.-L.; Zhu, Y.-G.; Su, J.-Q.; Gillings, M. R.; Ye, Z.-L.; Cui, L. (2017) Application of Struvite Alters the Antibiotic Resistome in Soil, Rhizosphere, and Phyllosphere. Environ. Sci. Technol, 51 (14), 8149–8157.

Cheng, S.; Shi, M.; Xing, L.; Wang, X.; Gao, H.; Sun, Y. (2020) Sulfamethoxazole Affects the Microbial Composition and Antibiotic Resistance Gene Abundance in Soil and Accumulates in Lettuce. Environ Sci Pollut Res 27 (23), 29257–29265.

De la Cruz, N.; Giménez, J.; Esplugas, S.; Grandjean, D.; de Alencastro, L. F.; Pulgarín, C. (2012) Degradation of 32 Emergent Contaminants by UV and Neutral Photo-Fenton in Domestic Wastewater Effluent Previously Treated by Activated Sludge. Water Research 46 (6), 1947–1957.

Díaz-Cruz, M. S.; López de Alda, M. J.; Barceló, D. (2006) Determination of Antimicrobials in Sludge from Infiltration Basins at Two Artificial Recharge Plants by Pressurized Liquid Extraction–Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry. Journal of Chromatography A, 1130 (1), 72–82.

García-Galán, M. J.; Díaz-Cruz, S.; Barceló, D. (2013) Multiresidue Trace Analysis of Sulfonamide Antibiotics and Their Metabolites in Soils and Sewage Sludge by Pressurized Liquid Extraction Followed by Liquid Chromatography–Electrospray-Quadrupole Linear Ion Trap Mass Spectrometry. Journal of Chromatography A 2013, 1275, 32–40.

Gismera, M. J.; Quintana, M. C.; Da Silva de Campos, M. P. (2009) Introducción a la cromatografía líquida de alta resolución; UAM Ediciones, Madrid.

Lorenzo, S.; Simal-Lozano, J. (2013) Medioambiente y salud: una visión analítica sobre los contaminantes prioritarios y de interés emergente; NINO-Centro de Impresión Digital, Santiago de Compostela.

Luque-García, J. L.; Luque de Castro, M. D. (2003) Ultrasound: A Powerful Tool for Leaching. TrAC Trends in Analytical Chemistry 22 (1), 41–47.

Nieto, A.; Borrull, F.; Marcé, R. M.; Pocurull, E. (2007) Selective Extraction of Sulfonamides, Macrolides and Other Pharmaceuticals from Sewage Sludge by Pressurized Liquid Extraction. Journal of Chromatography A, 1174 (1–2), 125–131.

Petrovic, M (2003). Analysis and Removal of Emerging Contaminants in Wastewater and Drinking Water. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 22 (10), 685–696.

Seidi, S.; Yamini, Y. (2012) Analytical Sonochemistry Developments, Applications, and Hyphenations of Ultrasound in Sample Preparation and Analytical Techniques. Open Chemistry, 10 (4), 938–9767.

Tetzner, N. F.; Maniero, M. G.; Rodrigues-Silva, C.; Rath, S. (2016) On-Line Solid Phase Extraction-Ultra High Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry as a Powerful Technique for the Determination of Sulfonamide Residues in Soils. Journal of Chromatography A, 1452, 89–97.

7. Eskerrak eta oharrak

Egileok eskerrak eman behar dizkiegu UPV/EHUren doktoretza ondorengo laguntzarengatik, eta ministerioari proiektu laguntzarengatik (Nuevas metodologías para evaluar el impacto de los contaminantes emergentes en ecosistemas marinos y el consumo de alimentos proiektua, CTM2014-56628-C3-1-R) eta EJ-GVri Elkarte 20/07 (KK-2020/0007) proiektuagatik eta A-motako Talde kontsolidatua laguntzarengatik (IBeA en medio ambiente físico, urbano construido, recursos naturales y salud, IT1213/19 eta IT-742- 13).

Molekulen elkarrekintzen eragina materia makroskopikoaren antolaketan: teobromina molekularen nukleazioaren bidez

Usabiaga Gutierrez, I.[1,2], Parra Santamaria, M.[1,2], Camiruaga Leza, A.[1], Lamas Frejo, I.[1] eta Veloso Fernández, A[1]

[1]*Kimika Fisikoa Saila, Zientzia eta Teknologia Fakultatea UPV/EHU, Sarriena auzoa z/g, 48940, Leioa*

[2]*Biofisika Institutua (UPV/EHU,CSIC) Sarriena auzoa z/g, 48940, Leioa*

i.usabiaga@outlook.es, maider.parra@ehu.eus

Laburpena

Elkarrekintza intra- zein inter-molekularren ondoriozko molekulen antolaketa ikertzea ezinbestekoa da molekulen propietateak ulertu ahal izateko. Erronka hau gainditzeko beharrezkoa den zehaztasuna egoera-isolatutako ikasketekin lor daiteke. Kasu honetan, azido desoxirribonukleiko eta azido erribonukleikorekin elkarrekintzak eratzeko ahalmena duen teobrominaren nukleazioa aztertu da. Horretarako, Ioi-Despopulazioko Infragorri Espektroskopia Erresonante (Resonant Ion Dip Infrared Spectroscopy) motako laser-espektroskopia eta espantsio supersonikoaren arteko konbinazioa erabili da. Lortutako infragorri-espektroak, kalkulu konputazionalen emaitzak eta datu kristalografikoak konparatuz, teobromina-molekulek bikote edo hirukoteetan duten antolatzeko modua *sandwich* egiturari dagokiola zehaztu da.

Hitz gakoak: teobromina, xantina, gas-faseko espektroskopia, laser-espektroskopia.

Abstract

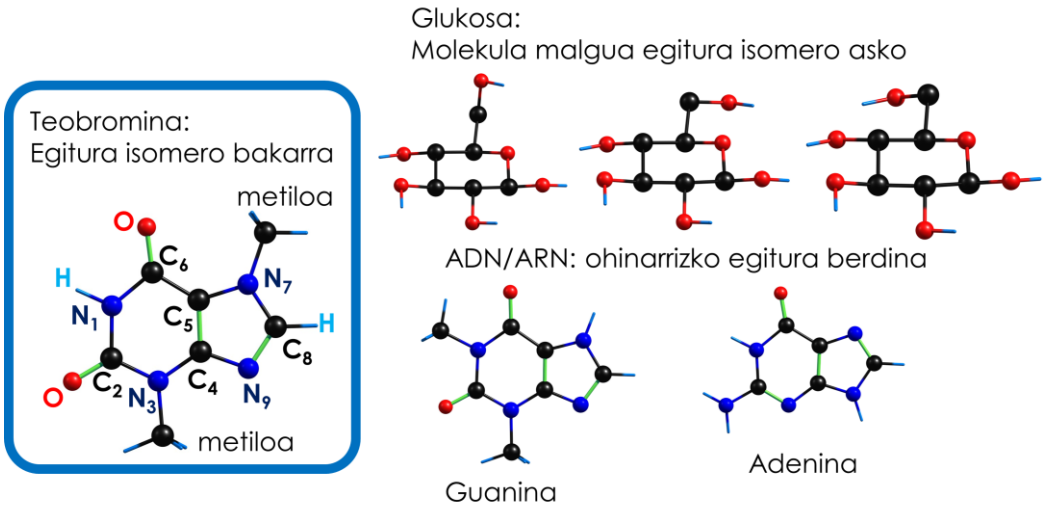
The organization of molecules resulting from intra- and intermolecular interactions is crucial in understanding the properties of molecules. The accuracy required to overcome this challenge is available in isolated studies. In this case, the nucleation of theobromine has been investigated due to its ability to form interactions with DNA and ARN. For this purpose, a combination between RIDIRS (Resonant Ion Dip Infrared Spectroscopy) laser spectroscopy and supersonic expansion has been used. The comparation among the obtained infrared spectra, computational calculations, and crystallographic data has determined that the sandwich structure is the one that theobromine molecules preferentially adopt when it comes to organize into pairs or triplets.

Keywords: xantine, gas-phase spectroscopy, laser-spectroscopy.

1. Sarrera eta motibazioa

Materiak makroskopikoki ikus eta neur daitezkeen orotariko propietateak aurkezten ditu. Azken hauek, materia berezi bihurtzen dute. Berezitasun hori aprobetxatuz, molekulen antolaketa aldatu eta materiak erakusten dituen propietate makroskopikoak guztiz eralda daitezke. Molekulak haien artean elkar eragiten dutenean modu desberdinetan antola daitezke. Biologia mailari dagokionez, bizitzarako ezinbestekoak diren erreakzio espezifikoak sustatzen dituzte. Materia ez-biziaren kasuan, elkarrekintzek egitura simetriko eta perfektuetan antolatzea eragin dezakete, kristalak osatuz adibidez. Ikerketa hau, indar hauen zergatia ulertzearen helburuarekin proposatzen da. Horretarako, ***teobromina***ren nukleazioa aukeratu da eredu gisa honen egitura zurruna dela eta. Horren ondorioz, molekula honek ez du egitura-isomerorik izango eta honek asko sinplifikatzen du honi buruzko ikerketa (ikusi 1. irudia). Teobromina xantinaren familiakoa da, zeinak base purikoen oinarrizko egitura kimikoa konpartitzen duten. Hauen egitura dela eta, hainbat elkarrekintza era dezakete Azido Desoxirribonukleiko (ADN) eta Azido Erribonukleiko (ARN) molekulekin, bestelako eragin farmakologikoak aurkeztuz. (Nemčeková et al., 2018; Zimmermann et al., 1997) Teobrominak amina talde guztiak metilo taldeez ordezkatuta ditu eta berezitasun hau oso interesgarria da elkarrekintzen ikerketarako, molekula bikotez osatutako konplexuen kopurua murrizten duelako oso lotura gune garrantzitsua izatearen ondorioz.

1. irudia. Eskumaldean Teobromina molekularen egitura adierazi da. Ezkerraldean hurrengoa adierazi da: goiko aldean glukosa molekula malguaren egitura-isomeroen multzo bat adierazi da adibide bezala eta azpian, ADN/ARN baseen egitura, zeintzuk guanina eta adeninazko oinarrizko purina-hezurdura duten.



Teobrominazko kristalak sortzeko sublimazioa erabiltzen da eta hauen egitura datu-base kristalografikoetan eskuragai dago. Kristal-egituratik hasita oinarrizko molekularen bikote eta hirukoterik egonkorrenak isola daitezke datu-base eta kalkulu teorikoetan oinarritutako ereduak jarraituz. Lehen urratsa, kristala sortzeko jarraitu beharreko pausuak erabakitzea izango da, aipatutako bikote eta hirukote egonkorretan oinarrituz. Hurrengo urratsa, konplexu hauek esperimentalki eratzean datza; hain zuzen, gas fasean isolatutako molekulen bikote eta hirukoteak lortzea izango da helburua. Horretarako, masan bereizgarria den laser-espektroskopia erabiliko dugu teobrominaren eta gas garraiatzaile baten espantsio supersonikoaren ikerketa egiteko. Teknika berezi honi buruzko zehetasunak jadanik argitaratuak izan dira (Usabiaga et al., 2016; Levy, 1980) eta honi buruzko ideia esanguratsuenak atal esperimentalean aurkeztuko dira. Teknika esperimental honek, tenperatura jaitsiera azkarren ondorioz gas fasean dauden molekulak isolatzen ditu bakarka, bikoteka, hirukoteka … Horri esker, kristalaren datu-basetatik eta kalkulu teorikoetatik lortutako bikote eta hirukoteekin alderaketak burutzea posible da.

2. Arloko egoera eta ikerketaren helburuak

Lan honen helburua teobromina molekularen nukleazioaren lehen urratsak metodo espektroskopikoen bitartez karakterizatzea da, ondoren bere kristal egiturarekin konparatzeko. Horretarako, erabilitako metodologia esperimentala eta teorikoari buruzko eztabaida burutuko da. Azkenik, teobrominaren egitura kristalografikoaren deskonposaketa oinarrizko egituratan egingo da, lortutako emaitzekin konparatzeko.

2.1. Masan bereizgarria den laser espektroskopiaren funtsak

Elkarrekintza intermolekular ahulak aztertzeko metodorik egokiena espantsio supersonikoen bitartez lortutako isolamendu molekularra da; hain zuzen, gas faseko eta espantsio supersonikoareen arteko konbinazioan oinarritutako metodo esperimentala. Espantsio supersonikoa gas garraiatzaile bat (gas noblea oro har) presio altuagoko ganbaratik hutsean aurkitzen den beste ganbara batera zirrikitu txiki batetik hedatzearen ondorioz sortzen da. Espantsioaren hasieran ematen diren energia altuko talken ondorioz, molekulen barne-energia abiadura modura transferitzen da, bere energia-mailak murriztuz edo “izoztuz” (maila elektronikoak, maila bibrazionalak, maila errotazionalak). Espantsioaren hasieran ematen diren talken ondorioz, monomeroak ez ezik, bi molekulen arteko konplexuak era daitezke; adibidez, dimeroak. molekulen artean sortutako elkarrekintzen ondorioz osatuak. Espantsioan zehar molekulak edota konplexuak norabide berean garraiatzen dira haien arteko

talkarik gabe. Horren ondorioz, ingurumen isolatua osatzen da eta horrek, molekularen propietate intrintsekoak aztertzea baimentzen du.

Molekulak eta konplexuak isolatzeko metodo hau bestelako teknika esperimentalekin konbinatu daiteke. (Lubman eta Kronick, 1982) Gure kasuan, laser-espektroskopia molekularrean oinarritutako teknika masa espektrometro batekin konbinatuz, molekula edota edozein tamainako konplexuen egiturari buruzko informazioa eskura dezakegu (Hollas, 2004).

Erresonantzia bikoitzeko ioi-despopulazioko infragorri espektroskopia (RIDIRS), molekulen arteko bazterketa burutzeko gai den teknika da, konplexuen bibrazio-frekuentziak erabilita. Teknika honetan, bi laser iturri desberdin erabiltzen dira. Lehenik, espantsio supersonikoan zehar aurkitzen diren molekulak infragorriko laserrarekin aztertzen dira. Ondoren, ultramoreko laserrak aipatutako molekulak kitzikatzen ditu euren ioiak eskuratzeko asmoz. Azken hauek, Hegaldi-denborako Masa-espektrometria (Time-of-light mass spectrometry, TOF) motako masa espektrometrora eraman eta masaren araberako bereizketa burutzen da. Azkenik, sortutako ioi-kopuruaren araberako seinale elektrikoa sortzen da detektorean. Aztertutako molekulek infragorrian bibrazioren bat aurkeztean (IR-laserraren uhin-luzera konkretu batean), sortutako ioi-kopurua aldatuko da, eta ondorioz, baita neurtutako seinalea ere. Beraz, seinalearen aldaketak neurtuz, gure molekularen edota konplexuaren IR-espektroa lortzen da, zein kalkulu teorikoekin aldera daitekeen egitura-zehaztapena burutzeko.

2.2. Kalkulu teorikoen funtsak

Molekula isolatuen propietateak esperimentalki neurtu ahal izateak, emaitza esperimentalak mekanika kuantikoko kalkulu teorikoen bitartez lortutako emaitzekin konparatzea baimentzen du. Horretarako jarraitu beharreko prozedura 2. irudian agertzen da eta hiru etapa nagusitan banatzen da: (i) mekanika klasikoan oinarritutako egiturak bilatzen dira (existitzeko probabilitate gehien dutenak hain zuzen ere); (ii) aurreko pausuan aurkitu diren egiturak zehatzago kalkulatzen dira mekanika kuantikoko legeak erabiliz; (iii) molekularen egitura ondo kalkulatuz gero, bere espektro teorikoa aurresan daiteke, ondoren esperimentuaren bidez lortutakoarekin konparatzeko. Modu honetan, espantsio supersonikoan lortutako datu esperimentalak, informazio konputazionalarekin alderatzeko eta euren arteko koherentzia determinatzeko erabili ez ezik, atal teorikoaren egokitasuna probatzeko baliogarriak dira.

2. irudia. Molekulen egiturak egiaztatzeko erabiltzen den prozedura.

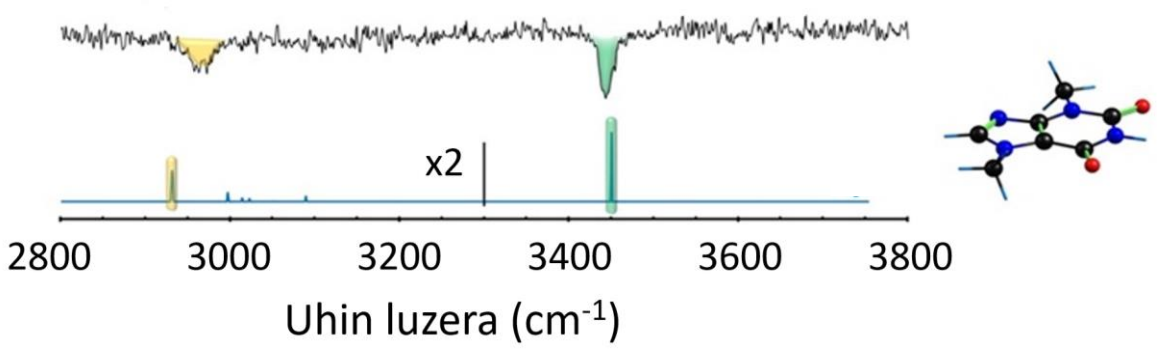
3. Ikerketaren muina

Atal honetan aurretik aipatutako metodologia jarraituz lortu diren emaitzen analisia azalduko da.

3.1. Teobrominaren egitura-zehaztapena

Aurretik aipatu den moduan, kalkulu teorikoen eta emaitza esperimentalen arteko alderaketaren ondorioz, molekula baten elkarrekintzen eta egituraren berri izan ahal dugu. Hau ulertzeko adibide bat, lan honetan ikertu dugun teobrominaren monomeroaren esleipena da. Molekula honen RIDIRS espektroa aspaldi neurtu zuten, (M.P. Callahan et al., 2008) zein gure ikerkuntzan lortutakoarekin bat datorren (3.irudia). Egindako molekulari buruzko kalkulu kuantikoei esker, honen bibrazio-frekuentzia teorikoak ezagunak izaten dira, zeinak espektro esperimentalarekin alderatzen diren egitura-zehaztapena burutu ahal izateko. 3. irudian antzeman daitekeen moduan, teobrominaren NH eta CH atomo-taldeen absortzioak aurkezten dira, esperimentuan isolatutako molekula/konplexua esleituz.

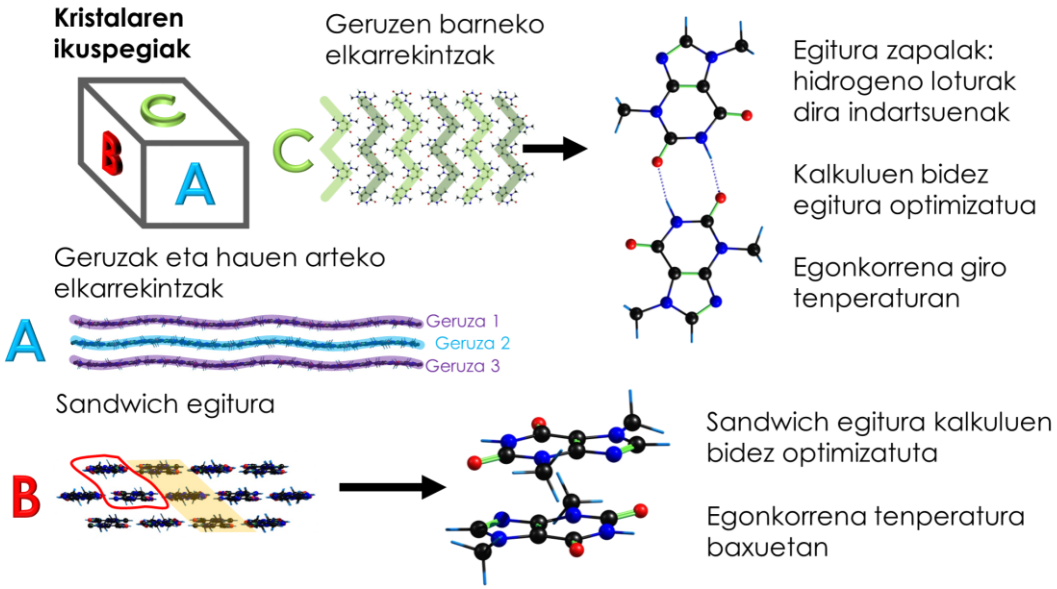
3. irudia. Molekulen egiturak egiaztatzeko erabiltzen den prozedura. Goialdean, espektro esperimentala eta behealdean, espektro teorikoa adierazi dira. Eskuman, esleitutako egitura adierazi da.



3.2. Kristal-egituraren deskonposaketa oinarrizko egituratan

Teobromina kristal-egituraren ikerketarako, molekulen elkarrekintzekin zerikusia duen deskonposaketa egitea beharrezkoa da egitura osoan zehar dauden patroirik esanguratsuenak identifikatuz. 4. irudia aztertuz gero, egitura osoa nola geruzatan antolatuta dagoen ikus daiteke. Geruzen arteko molekulek *sandwich* batean dauden ogi-xerrak bezala pilatzen dira euren artean. “A” analogia jarraituz, ogi-xerren artean elkarrekintza intermolekularrak egongo lirateke. Hau ikusita, geruzen artean sandwich eran dauden molekula bikoteak hartu eta kalkulu mekano-kuantikoen bidez egitura horiek optimizatuko ditugu gero bere egonkortasuna kudeatzeko

.4. irudia. Teobrominaren kristalaren deskonposaketa bere jatorrizko molekula bikoteetan



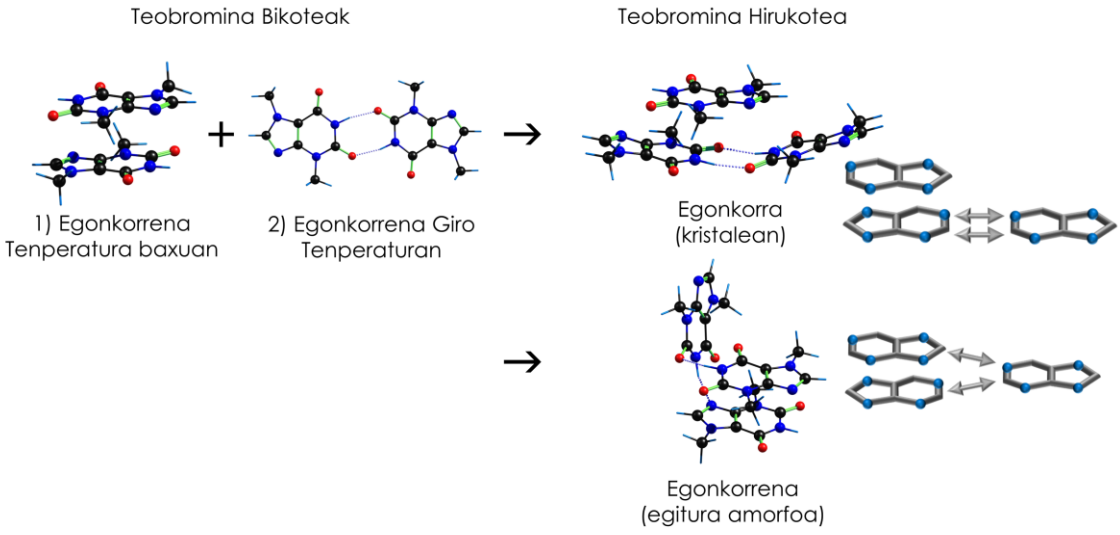
Kristalaren beste ikuspegi bat hartuta, geruza baten barruan dauden elkarrekintzak hainbat bikoteetan deskonposa ditzakegu. Hala ere, bikote bakarra erakutsiko du besteak baino egonkortasun handiagoa. Bikote honen berezitasuna bi hidrogeno-lotura indartsu aurkezten dituela da. Aipatutako elkarrekintzaren indarra kalkuluen bidez argi geratu da optimizatutako egitura kristaletik hartutakoaren ia berdina dela ikustean.

Sandwich eta egitura zapalaren emaitzak alderatzean, egituraz gain, desberdintasun nabari gehiago daude. Sandwich egiturei dagokionez, badaude antzeko egonkortasuna eta kristalean ikusitako atalen antza duten egitura gehiago. Gainera, sandwich osagaien egituraren optimizazio teorikoa egitean aldaketa nabarmena antzematen dela ondoriozta daiteke hasierako bikotearen egitura eta kalkulu teorikoekin lortutakoa konparatuz. Izan ere, tenperatura baxuetan sandwich egiturak egonkorrenak dira orokorrean; aldiz, kalkulua giro-tenperaturan egitean, egitura zapala bihurtzen da egonkorrena.

Bikoteen kasuan, esperimentalki determinatutako egiturak sandwich egiturazkoak direla ondorioztatu da; hau da, tenperatura baxuetan egonkorrenak direnak. Espantsio supersonikoa hozteko prozesu bortitzaren ondorioa izan daiteke. Halaber, bestelako xantina bikoteetan aurkitutako elkarrekintza nagusienak hidrogeno-loturak izan dira. Kasu honetan, teobromina-bikoteen pilatzeko joera esperimentalki determinatu dugu ere. Gainera, sandwich egitura duten bikote isoenergetikoak daudenez badirudi teobromina molekulek bata bestearen gainean irristatzeko gaitasuna dutela.

Hirukoteei dagokionez, kristaletik optimizatutako egiturak eta kalkuluen bidez lortutakoak ikusita, egitura asko lortu direla esan daiteke. Baina guztietatik interesgarrienak eta egonkorrenak (tenperatura baxuan zein altuan), bi bikoteen konbinaketaren ondorioz lortutakoak dira (5. irudia). Hau ikusita, horren eraketa sandwich egiturari teobromina molekula bat gehitzean sortzen dela esan daiteke, bi jatorri desberdin edukita. Esperimentalki ikusitako bikotea sandwich egitura aurkezten duenez, bide honek gertatzeko probabilitate handiena duena dela ondoriozta genezake. Nahiz eta hirukotearen neurketa esperimentalean mota honetako hirukoteak sortzen direla konfirmatu, emaitzek eratu ahal den hirukote mota bakarra ez dela adierazten dute. Izan ere, sandwich egiturazko bi molekulen arteko elkarrekintzak ezartzen dituzten egiturak aurkitzea posiblea da, zeintzuk kristalarenarekin batera, egonkorrenak diren. Esperimentuaren ondoriozko hozte prozesu bortitzak, egitura guztiak sortzea eragiten du eta behin sortuak, ezin dira eraldatu. Horren ondorioz, solido amorfo bat lortzen dugu. Kristalean ostera hotz prozesuan eraldaketak gertatzen dira eta hauek zenbait elkarrekintzen moldaketak dakarte egitura makroskopiko ordenatua lortzeko.

5. irudia. Teobrominaren bikote eta hirukoteen egitura. Behealdean, kristala sortzeko bide posible bat adierazi da solido amorfoaren formazioarekin alderatuta.



4. Ondorioak

Lan honetan interes farmakologikoa aurkezten duen teobromina molekularen nukleazio-prozesuan parte hartzen duten elkarrekintzen garrantzia ikertu da. Horretarako, masan bereizgarria den laser espektroskopia erabili da espantsio supersonikoarekin konbinatuz. Aipatutako teknika kalkulu konputazionalekin eta iragarpen teorikoekin konbinatuz gero, bikoteen kasuan lortutako egiturarik egonkorrenak sandwich erakoak direla ondorioztatu da. Gainera, bikote isoenergetikoen presentziak teobromina molekulak bata bestearen gainean irristatzeko gaitasuna izan dezaketela erakusten du. Hirukoteei dagokionez, antzeko joera dagoela ondorioztatu da. Izan ere, hirukotea osatzen duten molekulen artean, haietako bi sandwich egitura moduan antolatzen direla eta hirugarrena bi hidrogeno loturaz haiei lotuta mantentzen dela ondorioztatu da. Bestetik, lortutako emaitzak fase isolatuan datu kristalografikoek aurkezten dituztenekin konektatuta daudela ikusi da. Azkenik, hau guztia kontuan hartuz, laser-espektroskopia eta espantsio supersonikoaren konbinaketa biomolekulen propietate intrintsekoen jatorria eta egitura zehatza determinatzeko teknikarik aproposenetarikoa dela azpimarra daiteke.

5. Etorkizunerako planteatzen den norabidea

Lan honetan, teobrominaren nukleazioari buruzko ikerketaren hasierako pausuak baino ez dira landu. Beraz, hemendik abiatuta hainbat erronka plantea daitezke. Izan ere, teobrominaren *kluster* ugari esperimentalki determinatzeko gai izan arren, emaitza esperimentalak ulertzeko beharrezkoak diren kalkulu konputazionalen kopurua izugarri handia da, horrek kostu ekonomiko handia suposatuz. Hala ere, erronka hau gaindituz joanez, etorkizuneko ikerketaren helburua teobrominaren nukleazio-prozesua fase isolatuan ikasten jarraitzea da bertan parte hartzen duten egitura guztien zehaztapen zehatza eta osoa eman ahal izateko, datu kristalografikoak oinarri gisa edukiz.

6. Erreferentziak

Callahan et al. (2008): “Non-standard base pairing and stacked structures in methyl xanthine clusters”, *Phys. Chem. Chem. Phys*., 10, 2819-2826.

Hollas (2004): *Modern Spectroscopy*, 4th Edition, John Wiley & Sons Ltd, West Sussex, England

Levy, D. H. (1980): “Laser Spectroscopy of Cold Gas-Phase Molecules”, *Annu. Rev. Phys. Chem*., 31, 197–225.

Lubman eta Kronick (1982): “Mass spectrometry of aromatic molecules with resonance-enhanced multiphoton ionization”, *Anal. Chem*., 54, 5, 660-665.

Nemčeková et al. (2018): “Interaction of DNA and mononucleotides with theophylline investigated using electrochemical biosensors and biosensing”, *Bioelechem*., 123, 182-189.

Usabiaga et al. (2016): “Modeling the tyrosine-sugar interactions in supersonic expansions: glucopyranose-phenol clusters”, *Phys.Chem.Chem.Phys.*, 18, 12457.

Zimmermann et al. (1997): “Interlocking structural motifs mediate molecular discrimination by a theophylline-binding RNA”, *Nat*., 4, 644-649.

7. Eskerrak eta oharrak

Ander Camiruaga. Iker Lamas eta Maider Parrak eskerrak ematen dizkiogu Eusko Jaurlaritzari eta UPV/EHU-ari, doktorego tesia egiteko emandako laguntza ekonomikoagatik. Imanol Usabiagak Euskal Herriko Unibertsitateak emandako doktore-osteko laguntza ekonomikoagatik. Azkenik, SGIKER (UPV/EHU) konputazio eta laser zerbitzuaren laguntza eskertzen dugu.

Fosfato kontzentrazioaren eta pH-aren determinazioa kolirio laginetan irudi digitalen analisia erabiliz

Berasarte, I., Bordagaray, A., Garcia-Arrona, R., Ostra, M., Vidal, M.

Kimika Aplikatua Saila, Kimika Fakultatea, Euskal Herriko Unibertsitatea, 20018 Donostia
irati.berasarte@ehu.eus

Laburpena

Irudi digitalen analisian (DIA) oinarritutako metodo bat garatu da pH-a eta fosfato kontzentrazioa kuantifikatzeko kolirio laginetan. Analisiak 96 putzuko mikroplakak eta *smartphone* batekin lortutako irudiak erabiliz egin dira. Fosfatoen determinazioa molibdeno urdina erreakzioan sortzen den konplexu urdinaren kolorea RGB kolore-sistemako R kanalarekin erlazionatuz egin da. pH-aren determinazioa horiaren eta urdinaren arteko kolore aldaketa ematen duen bromotimol urdina adierazlearekin egin da, PLS eredu baten bidez irudiaren histograma eta pH balioa erlazionatuz. Lortutako emaitzak erreferentziazko metodoak erabiliz balidatu dira, kromatografia ionikoa fosfatoentzat eta potentziometria pH-arentzat.

Hitz gakoak: irudi digitalen analisia, kolirio, fosfato, koloregrama

Abstract

A method based on digital image analysis (DIA) is described for the quantification of pH and phosphate concentration in eye drops. Analysis were carried out using 96-well microplates and images obtained with a smartphone. The determination of phosphate was made by relating the color of the blue complex formed in the reaction to the R channel of the RGB color system. The pH was measured using bromothymol blue indicator, which gives a color change between yellow and blue. The information of the pH measurement was extracted from histograms of the pictures and a PLS model was performed to quantify the values. The results obtained were validated using reference methods, ion chromatography for phosphates and potentiometry for pH.

Keywords: digital image analysis, eye drops, phosphates, color fingerprint

1. Sarrera eta motibazioa

Medikamentu oftalmikoak oso garrantzitsuak dira industria farmazeutikoan eta azken hamarkadetan gehien aztertu den ataletako bat izan da. Izan ere, medikamentu hauek efektu lokal onuragarria eragin behar dute inolako efektu kaltegarririk gabe, ez begietan ezta organismoan ere. Kolirioak, definizioz, gatza duten eta zuzenean begietako administrazio-bide gisa erabiltzen diren medikamentuak dira. Horretarako, malkoen ur-edukia eta ezaugarri fisiko-kimikoak (presio osmotikoa, pH-a, biskositatea eta gainazal-tentsioa) berdintzea bilatzen da. Pazienteen artean daukaten tolerantzia onaren ondorioz eta erabiltzeko erraztasunari esker, begi-gaixotasun askoren tratamenduan erabiltzen dira. Gainera, forma askotan daude eskuragarri: disoluzio akuoso edo olio modura, emultsioak, suspentsioak, *spray*-ak, gelak… (Baranowski et al., 2014).

Osagai nagusiena ura izaten da (% 97 eta % 99 bitarteko kontzentraziotan egoten da) eta honez gain, printzipio aktiboa, kontserbatzaileak, elektrolitoak eta eszipienteak ere edukitzen dituzte.

1. irudia. Kolirioen konposizio orokorra azaltzen duen eskema.

Printzipio aktiboa gaixotasunaren araberakoa da; kontserbatzaileak medikamentuaren baldintza egokiak mantentzeko gehitzen dira eta elektrolitoak oreka egokian egon behar dira, begiaren osasunaren adierazle baitira. Eszipienteetan arreta jarriz, hauen artean testura, biskositatea eta kolorearen egonkortasuna mantentzen dituzten substantzia kimikoak aurki daitezke, baita pH-a mantentzeko tanpoi bezala jokatzen duten beste konposatu batzuk ere. Kolirioen kasuan, eszipienteek malkoaren pH-a mantendu behar dute; 7,3ren eta 7,4ren artean dagoena. Tanpoi disoluzio desberdinak existitu arren, erabilienak fosfatoz osatutakoak izaten dira. Hala ere, azken urteetan fosfato kantitate altuak dituzten kolirioen erabileraren ondoriozko kaltzifikazio kasuak azaldu dira. Hau horrela, fosfatoa hidroxiapatita [$Ca_5(PO_4)_3(OH)$] kristal moduan hauspeatzen da. Fosfato tanpoiek eta pH-aren igoerak kristal honen eraketa handiagotzen dute, eta ondorioz, kornearen kaltzifikazioak (Martínez-Soroa et al., 2016).

Egoera arrunt batean fosfato kontzentrazioa oso txikia da; 1,45 mM ingurukoa. Epe motzez erabiltzen diren medikamentuen kasuan eszipienteekin dagoen kontaktua minimoa da, baina gaixotasun jakin batzuetan eguneroko pilaketek eszipiente kontzentrazioa nabarmenki handitu dezakete, kaltzio fosfato hauspeakinak areagotuz (Martínez-Soroa et al., 2016). Arazo hau saihesteko beharrezkoa da begi-tantetan dagoen fosfato kontzentrazio zehatza ezagutzea. Fosfatoak determinatzeko forma desberdinak existitzen dira, hala nola, Bereizmen Handiko Likido Kromatografia (HPLC, *High Performance Liquid Chromatography*) (Hebbi et al., 2019) eta ioi-kromatografia (Phatthiyaphaibun et al., 2010).

Aipatutako metodoez gain, fosfato kontzentrazioa "molibdeno urdina erreakzioa" izenekoaren bitartez ere determina daiteke. Metodo honetan fosfatoak molibdenoarekin osatzen duen konplexu urdinaren kolorea aztertzen da. Erreakzioa bi urratsetan gertatzen da: lehenengoan (1) "Keggin ioi" bat osatzen da, eta bigarrenean (2), horren erredukzioa ematen da kolore urdina duen produktua sortuz (Nagul et al., 2015). Konplexuaren kolorea UV-Vis espektrofotometria bidez neur daiteke, baita kolorimetrian oinarritutako beste metodo batzuen bidez ere (Knyazev et al., 2007; Pourreza et al., 2020).

$$PO_4^{3-} + 12\ MoO_4^{2-} + 27\ H^+ \rightarrow H_3PO_4(MoO_3)_{12} + 12\ H_2O \qquad (1)$$

$$H_3PO_4(Mo^{VI}O_3)_{12} + \text{erreduktorea} \rightarrow [H_4PMo^{VI}{}_8Mo^{V}{}_4O_{40}]^{3-} \qquad (2)$$

Bestalde, eta lagin mota hauen pH-a ezagutzea ere oso garrantzitsua izanik, determinazioa burutzeko metodorik erabiliena metodo potentziometrikoa dela ikusi da (Kodym et al., 2006). Dena den, pH-aren determinazioa adierazleak erabiliz ere egin daiteke, bromotimol urdina izeneko azido-base adierazlearekin adibidez: kolore horia dauka 6tik beherako balioetan eta urdina 7,6tik gorakoetan. Balio horien artean kolore berdearen hainbat tonalitate bereiz daitezke.

Hau horrela, bi determinazioak erreakzio kolorimetrikoetan oinarrituz egin daitezke, hau da, kolore aldaketa aztertuz. Kolorearen intentsitatea analito kontzentrazioarekin erraz erlaziona daitekeen propietatea da. Izan ere, Lambert-Beer legea horretan oinarritzen da, absorbantzia analito kontzentrazioarekiko proportzionala baita. Disoluzio baten irudi digital bat analizatuz analitoaren kolorea kuantifika daiteke. Azken urteetan, irudi digitalen analisia (DIA, *Digital Image Analysis*) asko garatu da, metodo azkar, sinple eta merkea izanik, egoera jakin batzuetan kolorearen intentsitatea analito kontzentrazioarekin erlazionatzen baitu (Lopez-Molinero et al., 2013; Santos Benedetti et al., 2015; Damasceno et al., 2015).

DIA teknika multzo batek osatzen du eta helburua aztergai den sistemari buruzko informazio analitikoa lortzea da, horretarako irudi digital bat erabiliz. Definizioz, irudi digital bat bi dimentsioko funtzio bat da (x, y) non *x* eta *y* balioek pixel (*picture element*) bakoitzaren kokapena adierazten duten. Pixel bat irudi baten osagairik txikiena da eta balio numerikoak edo intentsitateak izango ditu, kolore-sistema bakoitzean desberdinak izango direnak. Sistemarik ezagunena RGB kolore-sistema da, non irudia 0 eta 255 arteko balioetan banatzen den hiru kanaletako bakoitzean, hau da, kanal gorrian, berdean eta urdinean. Horrela, existitzen den koloreetako bakoitza kanalen arteko konbinazio bidez azaltzen da. Antzera funtzionatzen duten beste sistema batzuk ere existitzen dira, hala nola, HSV, CIELab edo YC_bC_r (Umbaugh, 2005). Sistema hauetatik erauzitako informazioa informazio analitiko kuantifikagarri bihurtu ahal izango da. Horrela, DIA freskagarrietan fosfatoak kuantifikatzeko, uraren gogortasuna ezagutzeko edota ur-laginetan merkurioa determinatzeko erabili da (Colzani et al., 2017; Damasceno et al., 2016; Jarujamrus et al., 2018).

Kasurik sinpleenean, analitoaren kontzentrazioa kanal indibidual batekiko zuzenki proportzionala izango da. Beste kasu batzuetan, ordea, iruditik erauzitako hainbat datu elkartuz datu-matrize konplexuagoak sortu beharko dira, konposatu nahasteak determinatu nahi direnean edo kolore aldaketa bat aztertzerako orduan, adibidez. Horrela, patroi edo lagin bat definitzeko aldagai bat baina gehiago erabiliko dira eta datu-matrize hauen analisia egiteko kimiometriaren erabilera ezinbestekoa bihurtuko da. Kimiometriak teknika matematiko eta estatistikoak erabiltzen ditu datu konplexuetatik informazio kimiko eta fisikoa erauzteko (Esbensen eta Swarbrick, 2018). Horrela, aldagai anitzeko datuen tratamendua ahalbidetzen duten algoritmoak erabili beharko dira, hala nola, Osagai Nagusi Bidezko Analisia (PCA, *Principal Component Analysis)*, datu multzoan aldagaien arteko erlazioak eta joerak aurkitzeko edo Minimo Karratu Partzialen Bidezko Erregresioa (PLS, *Partial Least Squares Regression*), aldagaien eta kontzentrazioaren matrizeak aldi berean erabiliz aldagai anitzeko kalibrazioa egin ahal izateko.

2. Arloko egoera eta ikerketaren helburuak

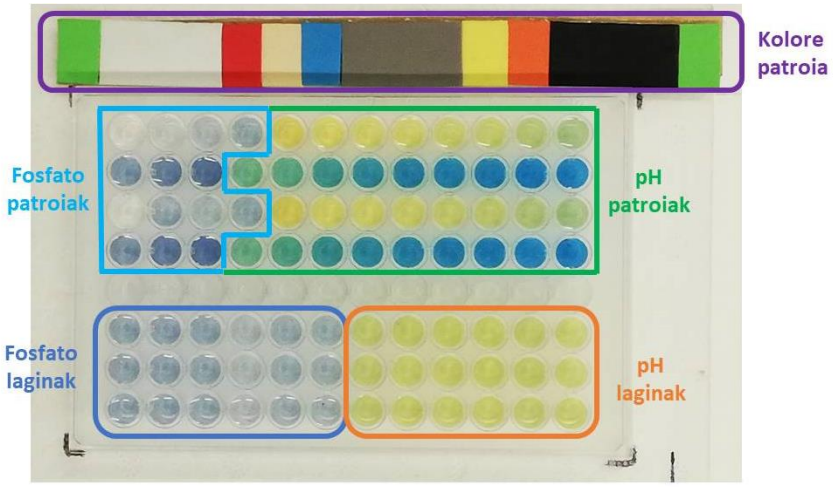
Printzipio aktiboek, eszipienteek eta kontserbatzaileek eragindako efektu kaltegarriak modu zabalean ikertu dira (Baranowski et al., 2014, Walsh eta Jones 2019, Agarwal et al., 2021). Esan bezala, fosfato kontzentrazio handiek kaltzifikazioak eragin ditzakete begietan, eta gainera, arazoa areagotu egiten da pH igoerarekin. 2019ko azarotik eta 2001/83/EC dekretuaren arabera, derrigorrezkoa da medikamentu oftalmikoek dauzkaten eszipiente guztiak etiketan agertzea, baina ez hauen kontzentrazioa (DIRECTIVE 2001/83/EC). Fosfato kontzentrazio zehatza eta pH-a ezagutzeak tratamenduaren aukeraketan eragin dezakeenez, ezinbestekoa da bi parametro hauek determinatzeko metodo sinple bat garatzea, erreferentziazko metodoek aurkezten dituzten zailtasunak (ekipoen kostu handia, analisi-denbora luzeak…) gainditzeko.

Lan honen helburu nagusia kolirio laginetan fosfato kontzentrazioaren eta pH-aren determinazioa burutzeko metodo azkar, sinple eta merke bat garatzea da, oinarritzat erreakzio kolorimetrikoak hartuz eta kolore aldaketak aztertzeko baliagarria eta aproposa den irudi digitalen analisia erabiliz (Berasarte et al., 2021).

3. Ikerketaren muina

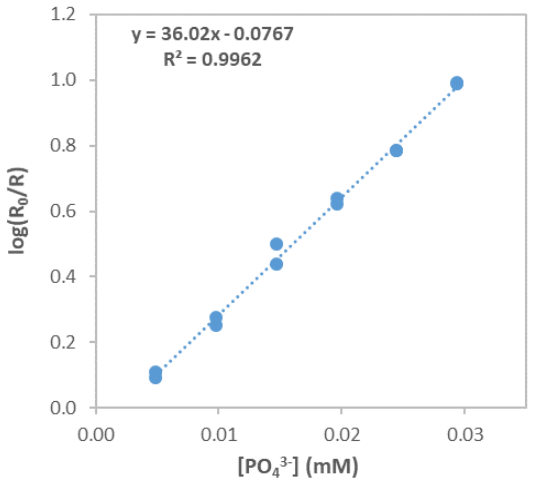
Esan bezala, garrantzitsua da kolirioetan pH-a eta fosfato kontzentrazioa ezagutzea. Determinazio horiek burutzeko 96 putzu dituzten mikroplakak erabili dira eta bi kasuetan kalibrazioa egiteko patroi disoluzioak eta laginak gehitu dira. Disoluzio bakoitzaren 400 µL erabili dira, argiztapena kontrolatzeko kolore patroia gehitu da eta irudiak telefono mugikor batekin eskuratu dira. Mugikorraren kameraren bereizmena 16 Mpx da eta argazkiak eskuratzeko parametro batzuk finkatu dira (ISO 200, irekidura 1/50 S eta "zurien balantzea" argi fluoreszentearentzat). Datuen erauzketa Matlab® softwarea erabiliz egin da.

2. irudia. Fosfato kontzentrazioaren eta pH-aren aldibereko analisia burutzeko mikroplaka non bi analisientzako patroiak eta laginak gehitu diren. Iluminazioa kontrolatzeko kolore patroia ere gehitu da.



Fosfatoaren determinazioa aldagai bakarreko kalibrazio bidez egitea lortu da, erlazio lineala baitago fosfato kontzentrazioaren eta RGB sistemako R kanalaren artean, ondorengo irudian ikus daitekeen bezala.

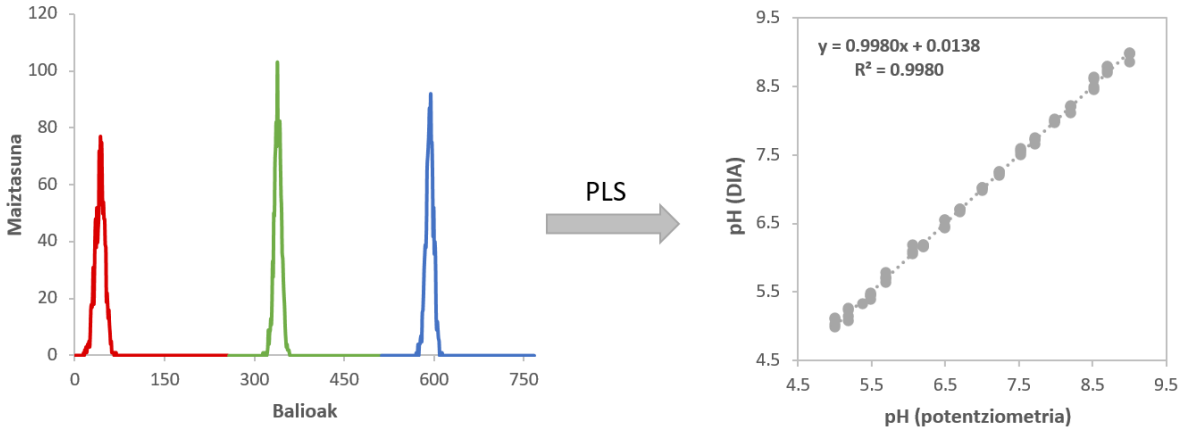
3. irudia. Fosfato kontzentrazioa determinatzeko eraikitako kalibrazio zuzena: fosfato kontzentrazioa eta log(R_0/R) parametroa zuzenki erlazionatzen dira.



Bestalde, pH-aren determinazioa bromotimol urdina azido-base adierazlearen kolore aldaketan oinarritzen da. Horregatik, kolore kanal bakar baten bidez eraikitako kalibrazioa ez da ondo egokituko eta patroi disoluzio bakoitzarentzat RGB sistemako histograma osoa hartuko da kontuan seinale gisa. Histograma hau sortzeko ***x*** ardatzean kanal bakoitzeko balioak adierazten dira (1 eta 256 artean R kanala, 257 eta 512 artean G kanala eta 513 eta 768 artean B kanala) eta ***y*** ardatzean balio bakoitzaren maiztasuna.

Ondorioz, erregresio lineala baino eredu konplexuago bat osatu behar izan da, PLS motako aldagai anitzeko erregresioak eskaintzen duen bezala (4. irudia). PLS-ak oinarritzat hartzen dituen hipotesiak (korrelazioak, zarata eta modulazio erroreak) beste algoritmoetan hartzen direnak baina errealistagoak dira, emaitza hobeak lortuz. Horregatik, pH-aren determinazioa egiteko erreminta egokiena da. Seinale kimikoa (histograma) eta erreferentziazko datuak (pH-a) kontuan hartuz eredu bat sortzen da. pH ezezaguneko laginen pH-a kalkulatzeko, lagin bakoitzaren histograma sortzen da, patroiekin bezala. Histograma hau ereduan sartuz, laginaren pH balioa predikzioz kalkulatzen da.

4. irudia. Ezkerrean, pH 7,24 disoluzio baten iruditik abiatuta lortutako histograma. Eskuinean, PLS algoritmoa erabiliz lortutako erregresio eredua non DIA bidez lortutako balioak irudikatu diren pH elektrodoarekin lortutakoen aurrean.



Metodoaren zuzentasuna egiaztatzeko, honen balidazioa egiten da. Metodoaren balidazioa analisi desberdinen bitartez sistemak emaitza analitiko egokiak ematen dituela balioztatzeko prozedura da (Thompson et al., 2002). Horretarako hainbat ezaugarri aztertzen dira, desberdinak aldagai bakarreko eta aldagai anitzeko analisietan. Parametro guztiak hurrengo taulan laburbildu dira.

1.taula. Fosfatoaren kontzentrazioa eta pH-a determinatzeko garatutako metodoren balidazioan lortutako parametroak.

Fosfato kontzentrazioa		**pH-a**	
Datuak	R kanala	**Datuak**	Histograma
Erregresioa	Lineala	**Erregresioa**	PLS
Linealtasuna (mM)	$5{,}0 \cdot 10^{-3} – 3{,}0 \cdot 10^{-2}$	**Tartea**	4,99 – 9,02
LOD (mM)	$1{,}8 \cdot 10^{-3}$	**RMSEC**	0,1
LOQ (mM)	$5{,}6 \cdot 10^{-3}$	**RMSEV**	0,46

Fosfatoaren kontzentrazioa aldagai bakarreko analisi bidez egin denez, linealtasuna, detekzio- eta kuantifikazio-mugak aztertu dira. Kalibrazioak linealtasun ona aurkezten du $5{,}0 \cdot 10^{-3} – 3{,}0 \cdot 10^{-2}$ mM kontzentrazio tartean, erregresio koefizientea (R^2) 0,9962 izanik. Detekzio-muga edo LOD (*Limit of detection*), fidagarritasunez detekta daitekeen kontzentraziorik txikiena, maldaren desbideratzearekin kalkulatu da, $1{,}8 \cdot 10^{-3}$ mM balioa lortuz. Kuantifikazio-muga edo LOQ (*Limit of quantification*), fidagarritasunez kuantifika daitekeen kontzentraziorik txikiena, detekzio-mugaren hirukoitza dela suposatu da, $5{,}6 \cdot 10^{-3}$ mM balioa lortuz. Aldagai anitzeko analisia egiten denean, ordea, beste parametro batzuk aztertzen dira. PLS erregresio eredua eraikitzeko pH 4,99 eta 9,02 arteko 17 tanpoi disoluzio erabili dira eta hori balidatzeko beste 5 tanpoi disoluzio ezberdin. Kalibrazioaren eta balidazioaren erroreak RMSE (*Root Mean Square Error*, batezbesteko errore koadratikoaren erroa) parametroen bidez ematen dira. Kasu honetan RMSEC (kalibrazioa) 0,1 eta RMSEV (balidazioa) 0,46 balioak lortu dira, antzeko magnitude-ordenakoak, eredua ondo egokitua dagoela adierazten duena.

Bi kasuetan balidazioan lortutako emaitzak egokiak dira, eta hortaz, garatutako metodoa laginetan aplika daiteke. Guztira 10 kolirio lagin desberdin analizatu dira eta DIA bidez lortutako emaitzen zehaztasuna eta doitasuna ebaluatu dira. Ebaluazio hau bi modu desberdinetan egin da: egun bereko argazkiak konparatuz eta egun desberdinen arteko argazkiak konparatuz. Lortutako emaitzak, errore erlatibo ehunekotan, 2.taulan adierazi dira.

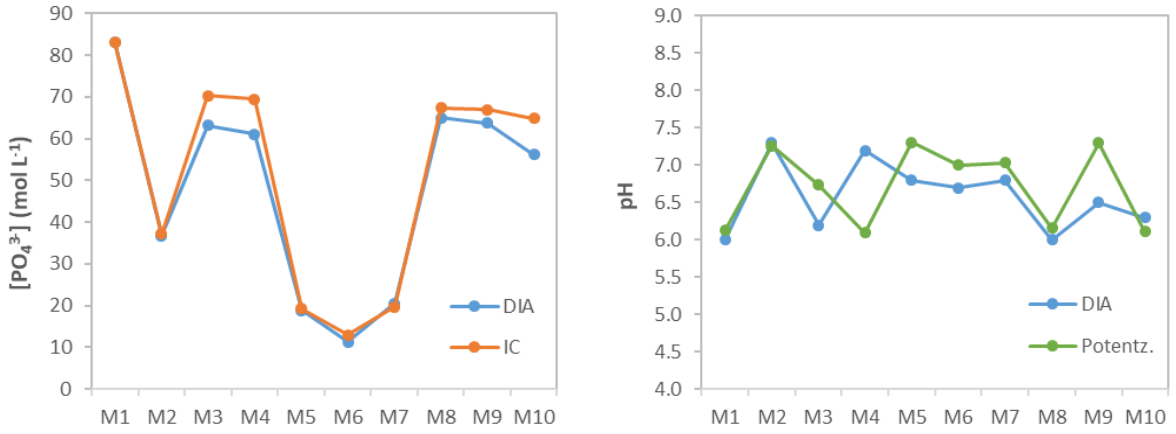
2.taula. DIA bidez lortutako emaitzen zehaztasuna eta doitasuna laburbiltzen dituen taula.

	Zehaztasuna		Doitasuna	
	$[PO_4^{3-}]$	pH	$[PO_4^{3-}]$	pH
Egun bera	% 5,5 – 15,0	% 0,2 – 18,8	% 3,6 – 4,4	% 7,3 – 12,2
Egun desberdinak	% 1,8 – 5,6	% 1,0 – 19,6	% 9,5 – 12,8	% 1,1 – 6,1

Fosfato kontzentrazioarentzat lortutako balioak egokiak dira, % 15eko errore erlatiboaren azpitik baitaude. pH-aren determinazioan, ordea, doitasunaren balioak egokiak izan arren, zehaztasunaren erroreak onartutako balioetatik kanpo daude. Esan beharra dago balio horiek muturreko tanpoi disoluzioei dagozkiela. Hori horrela, ikusi da pH balio baxuenetan eta altuenetan ereduak egiten dituen predikzioak ez direla guztiz egokiak, eta hortaz, nahiz eta pH tartea 4,99 eta 9,02 artean egon, metodoa tarteko pH-tan erabiltzea da zuzenena.

Bukatzeko, DIA bidez lortutako emaitzak erreferentziazko metodoekin lortutakoekin konparatu dira, ioi-kromatografia fosfatoen kasuan eta potentziometria pH-arentzat. Hurrengo irudian irudikatu dira eskuratutako emaitzak.

5.irudia. DIA eta erreferentziazko metodo bidez lortutako emaitzen konparaketa: ezkerrean, fosfato kontzentrazioa; eskuinean, pH-a.



Bi kasuetan ikusi da DIAren eta erreferentziazko metodoen arteko desberdintasunak adierazgarriak ez direla. Horregatik, metodo berri hau fosfatoaren eta pH-aren aldibereko determinazioa egiteko arrakastaz aplika daiteke. Gainera, laginaren bolumena oso txikia denean, kolirioekin gertatzen den bezala, zailtasunak egon daitezke erreferentziazko teknikak aplikatzerako orduan. Lehenago aipatutako abantailez gain, metodo hau arazo horiek ere saihesteko baliagarria da.

4. Ondorioak

Irudietatik ateratako kolorearen propietate ezberdinak, R kanala fosfatoaren determinaziorako eta histograma pH-aren kasuan, hurrenez hurren, $[PO_4^{3-}]$ eta $[H^+]$ kontzentrazioekin erlaziona daitezkeela frogatu da, horretarako erregresio lineala eta PLS motako aldagai anitzeko erregresioa erabiliz. Azpimarratu behar da garatutako prozedurak 400 µL baino ez dituela behar, eta gainera, lagin mota desberdinetan aplika daitekeela. Alde batetik, lagin-bolumenaren arazoari irtenbidea jartzen zaio: lagin gutxi dagoenean, begi-tantekin gertatzen den bezala, zaila izan daiteke prozedura edo determinazio batzuk aurrera eramatea

erreferentziazko teknikekin. DIA eta mikroplakak erabiliz arazo hori saihestu egiten da. Bestalde, kimika berdearen hondakinak gutxitzeko eskakizunekin bat datorren metodoa da, eta gainera, mikroplakak berrerabiltzeko aukera dago. Sentsibilitate handikoa izan daitekeen metodoa dela ikusi da, erregresio onak lortu baitira landutako bi aplikazioetan. Irudien egokitasuna ziurtatzeko ezinbestekoa da argiztapenaren kontrola egitea, kasu honetan kolore patroia erabiliz egin dena. Metodo honek sinpletasuna eskaintzen du erreferentziazko tekniken aurrean: azkarragoa da, irudi berarekin parametro desberdinak determina daitezke aldi berean eta merkeagoa da, beharrezko tresneria oso eskuragarria delako.

5. Etorkizunerako planteatzen den norabidea

Metodoaren abantailak eta aplikazio aukera guztiak ikusita, aipatutako aplikazioaren garapen handiagoa egin daiteke, DIA gai baita espektrofotometria bidezko analisiak ordezkatzeko. Horrela, hurrengo urratsetako bat izango da kolirioetan garrantzitsuak diren elektrolitoak kuantifikatzea, hau da, sodio, potasio, kaltzio eta magnesio kontzentrazioak ezagutzea. Horretarako, zilar nanopartikulekin eman dezaketen kolore aldaketa aztertuko da. Gainera, eta mikroplaken erabileraz haratago, paper oinarria duten mikrogailu (*Micro Paper Analytical Device*, µPAD) baten garapena ikertuko da, non paperean erreakzioa burutzeko beharrezko erreaktiboak immobilizatzen diren.

6. Erreferentziak

Agarwal, P., Craig, J.P., Rupenthal, I.D. (2021). Formulation considerations for the management of dry eye disease. *Pharmaceutics*, 13, 207

Baranowski, P., Karolewicz, B., Gajda, M., Pluta, J. (2014). Ophthalmic drug dosage forms: characterisation and research methods. *The Scientific World Journal*, 1–14.

Berasarte, I., Bordagaray, A., Garcia-Arrona, R., Ostra, M., Vidal, M. (2021). pH measurement and phosphate determination in pharmaceutical eye drops for eye diseases by digital image analysis. *Microchemical Journal*, 162, 105854.

Colzani, H., Araujo Garces Rodrigues, Q.E., Fogaça, C., Lafayette Neves Gelinski, J.M., Pereira-Filho, E.R., Borges, E.M. (2017). Determinação de fosfato em refrigerantes utilizando um scanner de mesa e análise automatizada de dados: um exemplo didático para ensino de Química. *Quimica Nova*, 40, 833–839.

Damasceno, D., Toledo, T.G., Godinho, M.S., da Silva, C.P., de Oliveira, S.B., de Oliveira, A.E. (2015). Análise multivariada de imagens na química: um experimento para determinaçao do pH de águas potáveis. *Quimica Nova*, 38, 836–841.

Damasceno, D., Toledo, T.G., da Silva Soares, A., Botelho de Oliveira, S., Elcana de Oliveira, A. (2016). CompVis: a novel method for drinking water alkalinity and total hardness analysis, *Anaytical Methods*, 8, 7832–7836.

DIRECTIVE 2001/83/EC OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL of 6 November 2001 on the Community code relating to medicinal products for human use.

Esbensen, K.H., Swarbrick, B. (2018). *Multivariate Data Analysis*, 6th ed.; CAMO Software AS, Oslo, Norvegia.

Gilbard, J.; Pardo, D. (2005). Lubricant eye drops, the electrolyte factor. *Optometry today*.

Hebbi, V., Chattopadhyay, S., Rathore, A.S. (2019). High performance liquid chromatography (HPLC) based direct and simultaneous estimation of excipients in biopharmaceutical products. *Journal of Chromatography B*, 1117, 118-126.

Jarujamrus, P., Meelapsom, R., Pencharee, S., Obma, AP., Amatatongchai, M., Ditcharoen, N., Chairam, S., Tamuang, S. (2018). Use of a smartphone as a colorimetric analyser in paper-based devices for sensitive and selective determination of mercury in water samples. *Analytical Sciences*, 34, 74-81.

Knyazev, D.A., Zhevnerov, A.V., Ivanov, V.M., Knyazev, V.D. (2007). Blister-colorimetric determination of phosphate ions in water, agricultural samples, and biological samples. *Journal of Analytical Chemistry*, 62, 37-41.

Kodym, A., Zawisza, T., Taberska, J., Kukula, H. (2006). Physicochemical and microbiological properties of eye drops containing cefuroxime. *Acta Poloniae Pharmaceutica*, 63, 293–299.

Lopez-Molinero, A., Tejedor Cubero, V., Domingo Irigoyen, R., Sipiera Piazuelo, D. (2013). Feasibility of digital image colorimetry—Application for water calcium hardness determination, *Talanta*, 103, 236–244.

Martínez-Soroa, I., De Frutos-Lezaun, M., Ostra Beldarrain, M., Egía Zurutuza, A., Irastorza Larburu, M.B., Bachiller Cacho, M.P. (2016). Determination of phosphate concentration in glaucoma eye drops commercially available in Spain. *Archivos de la Sociedad Española de Oftalmología*, 91, 363-371.

Nagul, E.A., Mckelvie, I.D., Worsfold, P., Kolev, S.D. (2015). The molybdenum blue reaction for the determination of orthophosphate revisited: opening the black box. *Analytica Chimica Acta*, 890, 60–82.

Phatthiyaphaibun, K., Som-Aum, W., Srisa-Ard, M., Threeprom J. (2010). Determination of pheniramine enantiomers in eye drop by capillary electrophoresis using hydroxypropyl- β-cyclodextrin as chiral selector. *Journal of Analytical Chemistry*, 65, 755-759.

Santos Benedetti, L.P., Bezerra dos Santos, V., Silva, T.A., Benedetti-Filho, E., Martins, V.L., Fatibello-Filho, O. (2015). A digital image analysis method for quantification of sulfite in beverages, *Analytical Methods*, 7, 7568–7573.

Pourreza, N., Sharifi, H., Golmohammadi, H. (2020). A green chemosensor for colorimetric determination of phosphate ion in soil, bone and water samples using curcumin nanoparticles. *Analytical Sciences*, 20P101.

Thompson, M., Ellison, S.L.R., Wood, R. (2002). Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis (IUPAC technical report). *Pure Applied Chemistry*, 74, 835-855.

Torras, J.; Moreno, S. (2006). Lágrimas Artificiales. *Annals d' Oftalmologia*, 14, 70–84.

Umbaugh, S.E. (2005). *Computer imaging: digital image analysis and processing*, CRC Press, Boca Raton, FL.

Vidal, M., Garcia-Arrona, R., Bordagaray, A., Ostra, M., Albizu, G. (2018) Simultaneous determination of color additives tartrazine and allura red in food products by digital image analysis, *Talanta*, 184, 58–64.

Walsh, K., Jones, L. (2019). The use of preservatives in dry eye drops. *Clinical Ophthalmology*, 13, 409-425.

7. Eskerrak eta oharrak

Ikerketa hau Euskal Herriko Unibertsitatearen proiektu ezberdinen bidez finantzatu da (GIU 16/55, GIU 19/13 eta US 18/09 proiektuak). Erabilitako laginak Donostiako Ospitaleko Itziar Martinez Soroa medikuari esker lortu dira.

Nanopartikulen lipido konposizioak rHDLen kolesterol kanpora-fluxuaren efizientzian eragina du

Jebari-Benslaiman, S.[1,2],Uribe, K.B.[3], Benito-Vicente, A.[1,2], Galicia-Garcia, U.[1], Larrea-Sebal, A.[1], Alloza, I.[2,4,], Vandenbroeck, K.[2,4], Ostolaza, H.[1,2] eta Martín, C.[1,2]

[1]Biofisika Institutua (CSIC-EHU), 48940 Leioa
[2] Biokimika eta Biologia Molekularra Saila, EHU, 48940 Leioa
[3] Center for Cooperative Research in Biomaterials (CIC biomaGUNE), 20018 Donostia
[4] Biocruces Bizkaia Health Research Institute, 48903 Barakaldo

sjebari001@ikasle.ehu.eus

Laburpena

Aterosklerosia arteria nagusien intiman gertatzen den kolesterol metaketaren ondorioz garatzen da. Horren garrantzi klinikoa nabaria da, izan ere, aterosklerosiaren konplikazioek gaixotasun kardiobaskularrak eragin ditzakete. Aterosklerosiaren tratamendu zuzenerako, HDL naturalak imitatzen duten hainbat nanopartikulen diseinua burutu izan da (rHDL), ateroma plakako soberazko kolesterola iraizteko helburuarekin, hainbat entsegu kliniko aurrera eraman direlarik. Ikerketa honen helburua, lipido konposizio desberdina duten rHDLek kolesterola zeluletatik jasotzeko duten efizientzia aztertzea izan da. Erabilitako lipido konposizioak DPPC, DPPC:Chol:LysoPC, DPPC:CE:LysoPC eta soja jatorridun fosfatidilkolinak izan dira.

Hitz gakoak: apoA-I; rHDL; nanodiskoak; kolesterol kanpora-fluxua; aterosklerosia

Abstract

Atherosclerosis is developed as result of the accumulation of cholesterol within the intima of large arteries. The clinical significance of this disease is relevant as its complication could lead cardiovascular diseases. Recently, the development of several nanoparticles that mimic natural HDLs (rHDL) have been carried out with the aim of excreting excess cholesterol from atheroma plaque, which have been tested in clinical trials. The aim of this study was to assess the cholesterol efflux efficiency of rHDLs with different lipid composition. Lipid compositions used in this study were: DPPC, DPPC:Chol:LysoPC, DPPC:CE:LysoPC and Soy-PC.

Keywords: apoA-I; rHDL; nanodisc; cholesterol efflux; atherosclerosis

1. Sarrera eta motibazioa

Aterosklerosia arteria nagusietan kolesterola eta zuntz-elementuak pilatzea bereizgarri duen gaixotasuna da (Lusis, 2000), eta gaixotasun kardiobaskularren (GKBen) kausa nagusienetakoa. Izan ere, GKBak (bihotzekoak eta infartuak, besteak beste) aterosklerosiaren konplikazio klinikoak izan ohi dira.

Aterosklerosiaren eragileak dentsitate txikiko lipoproteinak edo LDLak (ingelesetik, *Low Density Lipoprotein*) izeneko partikula natural batzuk dira, "kolesterol txar" moduan ezagutzen direnak. Partikula horiek lipido eta apolipoproteinaz osatuta daude, eta kolesterola gibeletik beste ehunetara garraiatzeaz arduratzen dira, prozesu zelular askotarako ezinbesteko molekula baita kolesterola (Hevonoja et al., 2000).

LDL partikulak baina, gai dira gorputzeko arterien endotelioa zeharkatzeko eta haren azpian metatzeko, kaltegarria izan daitekeena (hortik "kolesterol txarraren" ezizena). Izan ere, behin LDLak arteria barnean daudela, oxidazioak eta aztetilazioak bezalako aldaketak jasaten dituzte (Alique et al., 2015; Hevonoja et al., 2000) eta horren ondorioz, makrofagoek, gure gorputza

garbitzeaz arduratzen diren zelulek, eraldatutako LDL partikulak barneratuko dituzte hartzaile bidez, haiek deuseztatzeko helburuarekin. LDL metaketa handiegia bada, makrofagoek kontrolik gabe barneratzen jarraituko dute erregulazio gabeko mekanismoen bidez, eta kolesterolez osatutako tantak euren barnean pilatuz joango dira, zelula apartsu bihurtuz. Egoera kontrolatu ezinik, beste zelula-mota batzuk erakarriko dituzte, eta hanturazko mekanismoak martxan jarriko dira, une horretan aterosklerosia garatzen hasiko delarik (Linton et al., 2000).

Hala, kolesterol gehiago eta zenbait zelula-mota pilatuko dira arteriaren gune azpiendotelialean. Horrez gain, zelulek ekoitzitako material zurrun batez estaltzen hasiko da, sortutako lesioa odol-korrontera jaria ez dadin. Denborak aurrera egin ahala, arteriako gune hori gero eta zabalagoa izango da, eta, ondorioz, odol-hodiaren diametroa estuagoa, plaka aterosklerotikoa eratuz (Heusch et al., 2014).

Benetako konplikazio klinikoa ateroma-plakaren zati bat desegonkortu eta askatzen denean gerta daiteke, tronboa edo odolbildua sortzen baita (Linton et al., 2000; Heusch et al., 2014). Izan ere, tronboak odol-hodi bat blokea dezake, eta, ondorioz, odol-hodia inguratzen duen ehuna hiltzen hasiko da, oxigeno-falta dela eta. Hala, ehun horren heriotzari infartu deitzen diogu, eta bihotzean gertatzen bada, bihotzekoa.

Esan beharra dago, egoera fisiologikoetan plaka horren garapena ekidin daitekeela; izan ere, gure organismoak baditu plakaren garapena saihesteko mekanismoak. Haien artean, dentsitate handiko lipoproteina edo HDL (ingelesetik, *High Density Lipoprotein*) izeneko partikula lipido-proteikoak daude. Horiek ere, kolesterola garraiatzeaz arduratzen diren partikula naturalak dira, baina, kasu honetan, LDLen kontrako prozesua egiten dute: soberazko kolesterola ehun periferikoetatik jaso eta gibelera eramaten dute, behazunarekin batera iraitzia izan dadin (Kosmas et al., 2018). Horregatik, HDLak “kolesterol on” moduan ezagutzen dira.

HDLak ere gai dira arteria-pareta zeharkatzeko, eta arteria barnean pilatzen hasi diren makrofagoetako kolesterola jasoko dute (Rosenson et al., 2012; von Eckardstein et al., 2001). Horretarako, HDLtan dagoen apoA-I apolipoproteinak makrofagoen mintz zelularraren hartzaileekin (ABCA1-ekin) interakzionatzen du, eta hartzaile horiek, kanal moduan funtzionatzen dutela, soberazko kolesterola pasatuko diote HDLari. Hasiera batean, HDLak sortu-berriak direnean, apoA-I proteina eta fosfolipidoez soilik eratutako partikula diskoidalak dira. Ondoren, kolesterola jasotzen duten heinean, lehendabizi kolesterol askea (Chol) eta gero, kolesterol esterifikatua (CE) edukiko dute euren barnean. Azkenik, HDL partikula helduak odol-korrontera itzuliko dira, gibeleraino (Linton et al., 2000; Rosenson et al., 2012).

HDLak kolesterolaren kanpora-fluxua edo kanporanzko kanpora-fluxua induzitzeagatik, HDL partikulak atero-babesleak direla jotzen da. Horren ondorioz, ikerketa-talde askok laborategian HDLak sintetizatu izan dituzte, kolesterolaren kanporatzea induzitzeko helburuarekin.

2. Arloko egoera eta ikerketaren helburuak

70 eta 80ko hamarkadetan sortu ziren lehen *in vitro* HDL partikulak; rHDLak hemendik aurrera (ingelesetik, *reconsituted HDL*). Horiek sintetizatzeko, HDLen proteina nagusia, apoA-I eta hainbat lipido-nahastura erabili ziren. Eta, hala, nanoeskalako partikula diskoidalak lortu ziren, HDL naturalen itxura bera zutenak. Geroztik, makina bat rHDL konbinazio argitaratu izan dira, eta haien funtzionaltasuna neurtu da ateroma-plakako zeluletatik kolesterola hartzeko gaitasunaren bidez, arrakasta itzelarekin (Cukier et al., 2017; Tang et al., 2016).

Ondoren, entsegu klinikoen bidez *in vivo* azterketak burutzen hasi ziren. Hala, gizakietan probatu ziren lehen rHDLak, MILANO-PILOT deituriko entsegu klinikoan izan zen, 2016an amaitu zena. Entsegu hartan, nanopartikulen soluzioa pazienteei administratzen zitzaien, zain barneko injekzio bidez. Ez zuten, alabaina, emaitza esanguratsurik lortu ateroma-plakaren murriztapenean, eta entsegu klinikoa bertan behera utzi zen (Nicholls et al., 2018).

Horren ostean, rHDL konposizio berriekin beste saialdi batzuk egin izan ziren, sistemaren efizientzia emendatzeko helburuarekin. Hala, gaur egun martxan dagoen AEGIS II (NCT03473223) entsegu klinikoan adibidez, rHDLen lipido-konposizio berri bat probatzen ari dira, konkretuki, sojaren fosfatidilkolinak (Soy-PC) dituen rHDLak.

Lan honetan, konposizio lipidiko desberdina duten lau rHDL mota prestatu eta karakterizatu ziren. Alde batetik, HDLek *in vivo* jasaten duten garapena islatzen duten hiru konposizio lipidiko erabili ziren: DPPC soilik, DPPC:Chol:LysoPC eta DPPC:CE:LysoPC. Bestalde, AEGIS II entsegu klinikoan erabiltzen diren antzeko rHDLak presatatu ziren, SoyPC rHDLak. Ondoren, ateroma plakaren garapenean parte hartzen duten zeluletan, rHDL horiek kolesterol kanpora-fluxua induzitzeko duten gaitasuna aztertu zen.

3. Ikerketaren muina

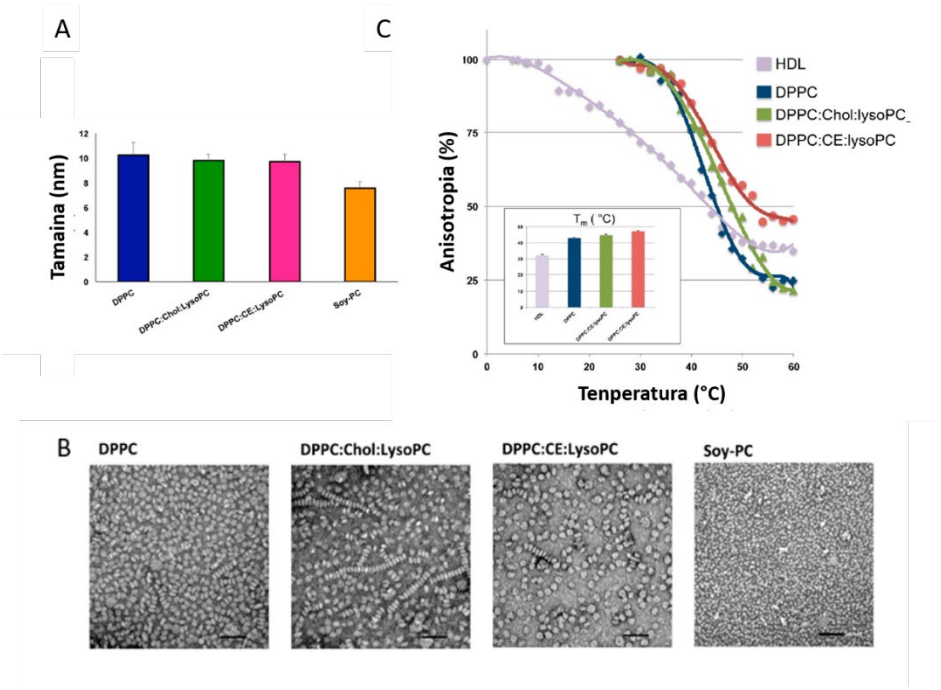
3.1. rHDLen prestaketa eta karakterizazioa

rHDLak apoA-I apolipoproteinaz eta lipidoz eratu ziren, aurretik deskribatutako protokoloan oinarrituta (Matz & Jonas, 1982). Horretarako, lehendabizi lipido konposizio desberdineko besikula multilamelarrak prestatu ziren: DPPC soilik, DPPC:Chol:LysoPC (8.5:1:0.5 erlazio molarrean), DPPC:CE:LysoPC (7.5:2:0.5 erlazio molarrean) eta Soy-PC soilik. Ondoren, aurretik purifikatutako apoA-I proteina lipido besikula nahastura mota bakoitzari gehitu zitzaion 1:125-eko erlazioan (M:M) 12 ordutan zehar inkubatzen utzi zirelarik. Nanopartikulak modu espontaneo batean eratzen dira, izan ere, apoA-I proteinak besikuletatik lipidoa hartu eta inguratzeko gaitasuna azaltzen du, azkenik, disko itxurako nanopartikulak (nanodiskoak) eratzen dituelarik, rHDLak alegia.

rHDL prestatu berriak gel filtrazio kromatografia bidez purifikatu ziren, nanodiskoak eratu ez zituzten lipido besikulelatik bereizteko. Intereseko frakzioa jaso, eta DLS (ingelesetik, *dynamic light scattering*) bidez intereseko tamaina zutela konfirmatu zen, partikulek dispertsatzen duten argian oinarrituta (1.A Irudia). Lipido konposizio desberdineko rHDL guztiak antzeko tamaina erakutsi zuten (9-10 nm). Egia da Soy-PC rHDLak tamaina txikiagoa erakutsi zutela DLSan, baina desberdintasun hori ez zen esangarria mikroskopia elektronikoko irudietatatik egindako neurketetan, tamaina zehatza neurtzeko teknika sentikorragoa dena. Horrez gain, transmisiozko mikroskopia elektronikoaren (TME) bidez nanopartikulen morfologia diskoidala aztertu zen (1.B Irudia). Ikusi daitekeenez, konposizio guztietan egitura desberdinak agertzen dira. Forma borobila nanopartikulen aurrealdeko aurpegia da; eta txanponen ilarak diruditen egiturak nanodiskoen alboko aurpegiari dagokie.

Bestalde, anisotropia fluoreszentea erabilita rHDL bakoitzaren trantsizio tenperatura aztertu zen (1.C Irudia). Horretarako, DPH molekula fluoreszentea erabili zen, rHDLen bigeruza lipidikoan tartekatzen dena. Tenperaturaren igoerarekin batera, rHDLen lipido geruzaren jariakortasuna emendatzen da eta, horrekin batera, DPHaren errotazio gradua. Hala, DPHaren errotazio mugimendua anisotropia balioarekiko alderantziz proportzionala izanik, tenperaturaren igoerarekin anisotropia jaitsiera kurbak lortzen dira. Jaitsiera horren inflexio puntua trantsizio tenperatura moduan ezagutzen da (Tm). Tm balioa nanopartikula konposizio bakoitzak duen zurruntasunari buruzko informazioa eskaintzen du: zenbat eta Tm balio txikiagoa, orduan eta estruktura zurrunagoa duela esan nahi du. Gure neurketetatik (1.C Irudia) DPPC rHDLen Tm-a 42,9 ± 0,3 °C dela ondorioztatu zen. DPPC:Chol:lysoPC eta DPPC:CE:lysoPC Tm-ak aldiz, 44,6 ± 0,6 eta 47,0 ± 0.5 °C zirela ondorioztatu, hurrenez hurren. Soy-PC rHDLen Tm-a ezin izan zen neurtu 0 ºC-tik behera, jada likido-kristalino fasean aurkitzen delako. Neurtutako Tm balioak, jarraian aztertuko den kolesterol kanpora-fluxu desberdintasunak azaltzeko erabiliko dira.

1. **Irudia. rHDLen karakterizazio biofisikoa.** (A) rHDLen tamaina DLS bidez. (B) Transmisiozko mikroskopia elektronikoko irudi errepresentatiboak (C) rHDLen trantsizio tenperaturaren neurketa anisotropía fluoreszentearen bidez.



3.2. rHDLen kolesterol kanpora-fluxuaren azterketa ateroma plakan parte hartzen duten zeluletan

rHDLen konposizio lipidikoak kolesterol kanpora-fluxuan duen eragina aztertu zen, THP-1 eta J774A.1 lerro zelularretan, giza eta sagu makrofagoetan hurrenez hurren. Horiez gain, aterosklerosia duten pazienteen ateroma plakatik eratorritako VSMCak erabili ziren (ingelesetik, *vascular smooth muscle cells*). Azken horiek, ateroma plakaren muskulu leuneko zelulak dira, zeinak zelula apartsu fenotipoa erakusten duten.

Hala, azterketa hura burutzeko, zelulak TopFluor-kolesterolarekin kargatu ziren lehendabizi eta gero, kolesterol fluoreszente horren kanpora-kanpora-fluxua aztertu zen, zelulak rHDL konposizio desberdinekin inkubatu ostean. Kontrol moduan giza-plasmatik purifikatutako HDL naturalak erabili ziren eta rHDLen kolesterol kanpora-fluxuaren balioak horrekiko konparatu ziren.

THP-1 makrofagoen kasuan (2.A Irudia), DPPC eta DPPC:Chol:LysoPC rHDLak HDL naturalek baino kolesterol kanpora-fluxu handiagoa azaldu zuten (% 51 eta % 34 gehiago, hurrenez hurren). Bestalde, DPPC:CE:LysoPC eta Soy-PC rHDLak, HDL naturalen antzeko efizientzia erakutsi zuten.

Antzeko emaitzak lortu ziren J774A.1 makrofagoetan (2.B Irudia), baina neurri txikiagoan. DPPC eta DPPC:Chol:LysoPC rHDLak HDL naturalek baino % 35 eta % 24 efizientzia handiagoa azaldu zuten, hurrenez hurren. Bestalde, kasu horretan ere, DPPC:CE:LysoPC eta Soy-PC rHDLak HDL naturalen antzeko efizientzia erakutsi zuten.

Horrez gain, J774A.1 makrofagoetatik zelula apartsuak lortu ziren, aurretik deskribatutako metodologian oinarrituz (Banka et al., 1991). Horretarako, zelulak azetilatutako LDLekin inkubatu ziren, zitoplasman lipido tantak behatu arte. Hala, J774A.1 zelula apartsuetan ere (2.C Irudia), DPPC rHDLek kolesterol kanpora-fluxu handiagoa induzitzen zuten, HDLekin alderatuz. Gainera, zelula apartsuetan lortu zen kolesterol kanpora-fluxua handiagoa izan zen, J774A.1 zeluletan lortu zen kanpora-fluxuarekin konparatuz (% 57 eta % 35, hurrenez hurren). DPPC:Chol:LysoPC eta DPPC:CE:LysoPC nanodiskoen inkubazioek ere adierazi zuten

kolesterol kanpora-fluxu emendatua HDLekin alderatuz (% 20 eta % 25, hurrenez hurren), Soy-PC rHDLek HDLen antzeko kolesterol kanpora-fluxua erakutsi zuten bitartean.

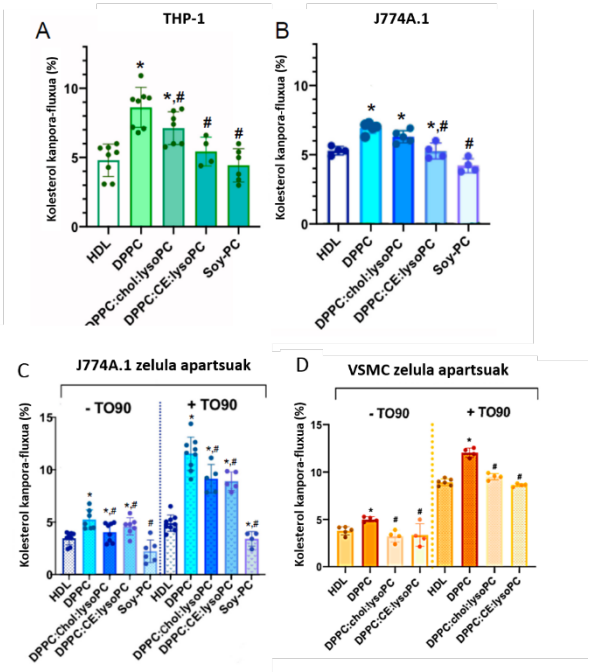
Ondoren, ABCA1 kolesterol garraiatzailearen gainadierazpenak kolesterol kanpora-fluxuan zuen eragina aztertu zen. Lehen esan bezala, ABCA1 kolesterol garraiatzaile bat da, kolesterola zeluletatik kanporatzen duena, HDLei pasaraziz. ABCA1 gainadierazpenarekin, lortutako kolesterol kanpora-fluxuen arteko desberdintasunak handiagoak izatea espero da. Horrez gain, kolesterol kanporaketa ABCA1 garraiatzailearen bidez gertatzen dela frogatzen da.

ABCA1-en gainadierazpena, J774A.1 zelula apartsuak TO90 erreaktiboarekin inkubatuz lortu zen eta rHDL desberdinek kolesterol kanpora-fluxuan zuten eragina aztertu zen. 2.C Irudian agertzen den moduan, ABCA1 garraiatzailearen gainadierazpenak modu esanguratsu batean emendatu zuen kolesterol kanpora-fluxua. Hala, DPPC rHDLek % 140 kanpora-fluxu gehiago erakutsi zuten HDL naturalekin alderatuz. DPPC:Chol:LysoPC eta DPPC:CE:LysoPC rHDLak aldiz, % 100-ko handipen bat erakutsi zuten HDLekiko. Bestalde, Soy-PC rHDLak induzitutako kolesterol kanpora-fluxua HDLen antzekoa izan zen.

Azkenik, azterketa bera VSMC zeluletan egin zen (2.D Irudia). Kasu horretan aldiz, DPPC-dun rHDLak kolesterol kanpora-fluxuaren igoera txikia (% 22) baina esanguratsua adierazi zuten, HDL naturalekin alderatuz. DPPC:Chol:LysoPC eta DPPC:CE:LysoPC rHDLak aldiz, HDLen antzeko kanpora-fluxua adierazi zuten.

VSMC zeluletan ere, ABCA1-en gainadierazpenak kolesterol kanpora-fluxuaren emendatzea eragin zuen baldintza guztietan. Horrez gain, eta orain arte behatu den bezala, DPPC-dun rHDLek kanpora-fluxu handiagoa eragin zuten HDL naturalekin konparatuta. Azkenik, bestelako rHDL konposizioek (DPPC:Chol:LysoPC eta DPPC:CE:LysoPC), HDLen antzeko kolesterol kanpora-fluxua induzitu zuten TO90 bidez estimulatutako VSMC zeluletan.

2. Irudia. rHDLek induzitutako kolesterol kanpora-fluxua THP-1 **(A)**, J774A1 **(B)**, J774A1 zelula apartsuetan **(C)** eta VSMC zeluletan **(D)**. Datuek 3 esperimentu independenteen bataz bestekoa adierazten dute. Esangura maila Student t testa bidez zehaztu zen. * HDLekin alderatuz ($p < 0.01$). # DPPC rHDLekin alderatuz ($p < 0.01$).



4. Ondorioak

Aurkeztutako emaitzetan oinarrituz, DPPC lipidoz soilik eratutako rHDLak izan ziren kolesterol kanpora-fluxu handiena induzitu zutenak. Horren azalpena DPPCak osatutako bigeruza lipidikoaren ezaugarrietan egon daiteke. Izan ere, anisotropia fluoreszentearen bidez, DPPC rHDLak izan ziren trantsizio tenperatura baxuena erakutsi zutenak, DPPC:Chol:LysoPC eta DPPC:CE:LysoPC rHDLekin alderatuz. Horrekin, DPPC nanopartikulak malguenak direla esan daiteke eta beraz, zeluletatik eratorritako kolesterola barneratzeko gaitasun handiagoa erakustea azaldu dezake. Hau da, HDL sortu-berrien antzekoak diren nanopartikulak (fosfolipidoez soilik eratuta daudenak) dira efizienteenak.

Bestalde, Soy-PC rHDLei dagokienez, kolesterol kanpora-fluxua murriztua adierazi zuten nahiz eta sojaren PC-en Tm-a baxuagoa izan. Horren azalpena aldiz, lipidoen saturazio mailan egon daiteke izan ere, Soy-PC lipidoaren % 80a gantz azido insaturatuen nahastura bat da, DPPCa lipido guztiz saturatua den bitartean. Eta aurretik deskribatu den bezala (Ma et al., 2012; Marmillot et al., 2007), lipido saturatuez eratutako rHDLek kolesterol kanpora-fluxu handiagoa induzitzea erakutsi dute.

Hitz gutxitan, rHDLen lipidoen ezaugarri fisikoak aintzat hartu beharko lirateke kolesterol kanpora-fluxua induzitzeko rHDLen diseinua egiteko unean.

5. Etorkizunerako planteatzen den norabidea

Azterketa honetan, rHDLen ezaugarri biofisikoak zeluletako kolesterol kanpora-fluxuan duten eraginari buruzko informazioa eskuratu zen. Informazio hori erabilita, diseinatutako rHDLak lesio aterosklerotikoetan agertzen den kolesterol extra-zelularra deuseztatzeko erabili nahi dira. Horrela, hurrengo pausua, DPPC-dun rHDLak pazienteen ateroma plaken mozketetan probatu nahi dira (animali ereduetara pasa baino lehen).

6. Erreferentziak

Alique, M., Luna, C., Carracedo, J., & Ramírez, R. (2015). LDL biochemical modifications: A link between atherosclerosis and aging. *Food & Nutrition Research*, *59*(1), 29240.

Banka, C. L., Black, A. S., Dyer, C. A., & Curtiss, L. K. (1991). THP-1 cells form foam cells in response to coculture with lipoproteins but not platelets. *Journal of Lipid Research*, *32*(1), 35-43.

Cukier, A. M. O., Therond, P., Didichenko, S. A., Guillas, I., Chapman, M. J., Wright, S. D., & Kontush, A. (2017). Structure-function relationships in reconstituted HDL: Focus on antioxidative activity and cholesterol efflux capacity. *Biochimica Et Biophysica Acta. Molecular and Cell Biology of Lipids*, *1862*(9), 890-900.

Heusch, G., Libby, P., Gersh, B., Yellon, D., Böhm, M., Lopaschuk, G., & Opie, L. (2014). Cardiovascular remodelling in coronary artery disease and heart failure. *Lancet (London, England)*, *383*(9932), 1933-1943.

Hevonoja, T., Pentikäinen, M. O., Hyvönen, M. T., Kovanen, P. T., & Ala-Korpela, M. (2000). Structure of low density lipoprotein (LDL) particles: Basis for understanding molecular changes in modified LDL. *Biochimica Et Biophysica Acta*, *1488*(3), 189-210.

Kosmas, C. E., Martinez, I., Sourlas, A., Bouza, K. V., Campos, F. N., Torres, V., Montan, P. D., & Guzman, E. (2018). High-density lipoprotein (HDL) functionality and its relevance to atherosclerotic cardiovascular disease. *Drugs in Context*, *7*, 1-9.

Linton, M. F., Yancey, P. G., Davies, S. S., Jerome, W. G., Linton, E. F., Song, W. L., Doran, A. C., & Vickers, K. C. (2000). The Role of Lipids and Lipoproteins in Atherosclerosis. En K. R. Feingold, B. Anawalt, A. Boyce, G. Chrousos, K. Dungan, A. Grossman, J. M. Hershman, G. Kaltsas, C. Koch, P. Kopp, M.

Korbonits, R. McLachlan, J. E. Morley, M. New, L. Perreault, J. Purnell, R. Rebar, F. Singer, D. L. Trence, *et al.* D. P. Wilson (Eds.), *Endotext*. MDText.com, Inc.

Lusis, A. J. (2000). Atherosclerosis. *Nature*, *407*(6801), 233-241.

Ma, C.-I. J., Beckstead, J. A., Thompson, A., Hafiane, A., Wang, R. H. L., Ryan, R. O., & Kiss, R. S. (2012). Tweaking the cholesterol efflux capacity of reconstituted HDL. *Biochemistry and Cell Biology*, *90*(5), 636-645.

Marmillot, P., Patel, S., & Lakshman, M. R. (2007). Reverse cholesterol transport is regulated by varying fatty acyl chain saturation and sphingomyelin content in reconstituted high-density lipoproteins. *Metabolism*, *56*(2), 251-259.

Matz, C. E., & Jonas, A. (1982). Micellar complexes of human apolipoprotein A-I with phosphatidylcholines and cholesterol prepared from cholate-lipid dispersions. *The Journal of Biological Chemistry*, *257*(8), 4535-4540.

Nicholls, S. J., Puri, R., Ballantyne, C. M., Jukema, J. W., Kastelein, J. J. P., Koenig, W., Wright, R. S., Kallend, D., Wijngaard, P., Borgman, M., Wolski, K., & Nissen, S. E. (2018). Effect of Infusion of High-Density Lipoprotein Mimetic Containing Recombinant Apolipoprotein A-I Milano on Coronary Disease in Patients With an Acute Coronary Syndrome in the MILANO-PILOT Trial: A Randomized Clinical Trial. *JAMA Cardiology*, *3*(9), 806.

Rosenson, R. S., Brewer, H. B., Davidson, W. S., Fayad, Z. A., Fuster, V., Goldstein, J., Hellerstein, M., Jiang, X.-C., Phillips, M. C., Rader, D. J., Remaley, A. T., Rothblat, G. H., Tall, A. R., & Yvan-Charvet, L. (2012). Cholesterol efflux and atheroprotection: Advancing the concept of reverse cholesterol transport. *Circulation*, *125*(15), 1905-1919.

Tang, J., Baxter, S., Menon, A., Alaarg, A., Sanchez-Gaytan, B. L., Fay, F., Zhao, Y., Ouimet, M., Braza, M. S., Longo, V. A., Abdel-Atti, D., Duivenvoorden, R., Calcagno, C., Storm, G., Tsimikas, S., Moore, K. J., Swirski, F. K., Nahrendorf, M., Fisher, E. A., Mulder, W. J. M. (2016). Immune cell screening of a nanoparticle library improves atherosclerosis therapy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *113*(44), E6731-E6740.

von Eckardstein, A., Nofer, J. R., & Assmann, G. (2001). High density lipoproteins and arteriosclerosis. Role of cholesterol efflux and reverse cholesterol transport. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, *21*(1), 13-27.

7. Eskerrak eta oharrak

Esker onak SGIker zerbitzuari (EHUko Biomedikuntza Zerbitzuko Mikroskopia Analitikoa eta Erresoluzio Handiko Mikroskopia) eta Rocío Alonsori emandako laguntza tekniko bikainagatik.

Lan hau Eusko Jaurlaritzak finantziatu du (Grupos Consolidados IT-1264-19). Taldearen finantziazioa: U.G.-G. eta A.L.-S. Fundación Biofísica Bizkaia, A.B.-V. UPV/EHUko ikertzaile doktoreen espezializaziorako Programa (2019), S.J.-B. eta A.L.-S. Eusko Jaurlaritzako PIF (2017–2018) eta PIF (2019–2020), hurrenez hurren.

Presa handi baten hustuketak eragindako efektu ekologikoak: Enobietako urtegiaren kasua (Artikutza, Nafarroa)

Atristain, M.[1], Larrañaga, A.[1], von Schiller, D.[2], Elosegi, A.[1]

[1] *Zientzia eta Teknologia Fakultatea, Euskal Herriko Unibertsitatea, PO Box 644, 48080, Bilbo, Bizkaia.*
[2] *Ekologia Departamentua, Biologia Fakultatea, Bartzelonako Unibertsitatea (UB), Diagonal Etorbidea 643, 08028 Bartzelona, Bartzelona.*

Kontakturako e-posta: miren.atristain@ehu.eus

Laburpena

Gero eta gehiago dira munduan bizi-itxaropenaren amaierara iristen ari diren urtegiak. Hori horrela, gero eta ohikoagoa da presa eta urtegiak hustu eta zerbitzuz kanpo uztea ibaien konektibitate longitudinala berreskuratzeko. Ikerketa honen helburua presa handi baten (Enobieta, 42 m) hustuketak ibai-ekosistemen ur-kalitatean eta biodibertsitate eta funtzionamenduan duen eragina aztertzea zen. Horretarako, Artikutzako sare hidrografikoan 8 puntu aukeratu ziren: presaren eraginpean zeuden 4 puntu (inpaktuak) eta inolako eraginik jasaten ez zuten beste 4 puntu (kontrolak). Horietan guztietan hainbat aldagai aztertu ziren hiru fasetan zehar. Aldagai ezberdinek modu ezberdinean erantzun zuten hustuketaren aurrean, baina orokorrean, hustuketak eragin ekologiko handirik ez zuela izan ikusi zen. Gainera, izandako inpaktuak berehala desagertu ziren errekuperazio-fasean zehar.
Hitz gakoak: urtegiak hustutzea, uraren kalitatea, ornogabeak, biofilmaren metabolismoa, landaredia

Abstract

There are more and more dams in the world that are coming to the end of their lifespan. Thus, dam removal is gaining momentum in order to recover stream and river´s longitudinal connectivity. The aim of this work was to assess the effects of the decommissioning of a large dam (Enobieta, 42 m) on water quality and stream biodiversity and functioning. For this purpose, 8 sampling points were selected in the hydrographic network of Artikutza: 4 of them were below the dam (impact sites) and 4 others were in free-flowing streams (controls). We measured various variables in all of these sites during three different phases. Each variable responded in a different way to the reservoir drawdown process, but in general, we found out that the emptying of the reservoir did not have almost any negative ecological effects, and if so, these impacts disappeared quickly during the recovery phase.
Keywords: reservoir drawdown, dam removal, water quality, invertebrates, biofilm metabolism, vegetation

1. Sarrera eta motibazioa

Gaur egun, munduko erreken emariaren % 25a presek oztopatu edo desbideratzen dute (Vörösmarty et al., 2010). Guztira, 50.000 bat presa handi (15 metro baino garaiagoak) eta txikiagoak diren 200.000 presa baino gehiago daude munduan, eta are gehiago daude eraikitzeko bidean (Nilsson et al., 2005; Zarfl et al., 2015). Hala ere, presa hauen bizi-itxaropena mugatua da, 50-100 urtekoa, eta jada hainbat dira munduan bizi-itxaropen horren amaierara iritsi direnak (Perera et al., 2021). Hori dela eta, eta ibai-ekosistemetako uraren kalitatean (Friedl eta Wüest, 2002), geomorfologian (Brandt, 2000) eta biodibertsitate (Wu et al., 2019) eta funtzionamenduan (Aristi et al., 2014; Maavara et al., 2020) dituzten inpaktuak kontutan hartuta, hauek hustu eta kentzea gomendatzen da (Perera et al., 2021).

Hala ere, presak kentzea epe luzera onuragarria izan daitekeen arren (Bellmore et al. 2019), oraindik horiek eraisteak ibai-ekosistemetan izan ditzakeen efektuak gutxi aztertu dira (Bushaw-Newton et al., 2002; Velinsky et al., 2006; Orr et al., 2008), eta are gutxiago presa handien kasuan.

2. Arloko egoera eta ikerketaren helburua

Donostiako udalak, 1919an, Artikutzako harana erosi zuen kalitatezko uraren horniketa bermatzeko. Horretarako, 1947an Enobietako urtegia diseinatu zen (Muñoz Echabeguren, 2003): 40,4 metroko sakonera eta 2,7 hm^3 biltegiratzeko ahalmena izango lituzke. Hala ere, presa eraikitzen ari zirela ikusi zuten ezker aldean urtegiaren egonkortasuna kolokan jartzen zituen marmol karstifikatuak zeudela. Arazoa konpontzeko hainbat saiakera egin zituzten arren, ez zuten arrakastarik izan, eta beraz, hormaren ezkerreko muturra amaitu gabe geratu zen. Erabaki horrek eragin zezakeen arriskuak ekiditeko, presa partzialki eraitsi zuten gainezkabidearen garaiera 5 metro jaitsiz. Ondorioz, urtegiaren gehienezko edukiera 1,6 hm^3-tara mugatu zen. Segurtasun arazoez gain, Enobietako urtegiak uraren kalitatearekin arazo ugari izan zituen. Hori guztia zela eta, erreka berean, baina kilometro batzuk beherago, Añarbeko urtegia eraiki zen (43,8 hm^3) 1976an. Hura martxan jarri zenetik, Enobietako urtegiak garrantzia galdu zuen eta mantentze-lanak pixkanaka murriztu ziren ia guztiz desagertu arte. 2016an Donostiako Udalak hura kentzea erabaki zuen, eta 2019an guztiz hustu zen.

Ikerketa honen helburu nagusia Enobietako urtegiaren hustuketak uraren kalitatean, biodibertsitatean eta ibai-ekosistemaren funtzionamenduan duen eragina aztertzea da. Gure hipotesiak ondoko hauek dira:

1) Urtegia beteta egoteak erreka kaltetuko du. Presatik behera urrundu ahala, kalte hori gutxitu egingo da.
2) Hustuketa-fasean, urtegian metatutako sedimentuak mobilizatuko dira, eta erreka kaltetu dezakete. Presatik behera urrundu ahala, efektu hori gutxitu egingo da.
3) Hustuketa ondorengo fasean, efektu hauek desagertu egingo dira, eta presatik beherako erreka-aldeek ibaiadarretakoen antza hartuko dute.

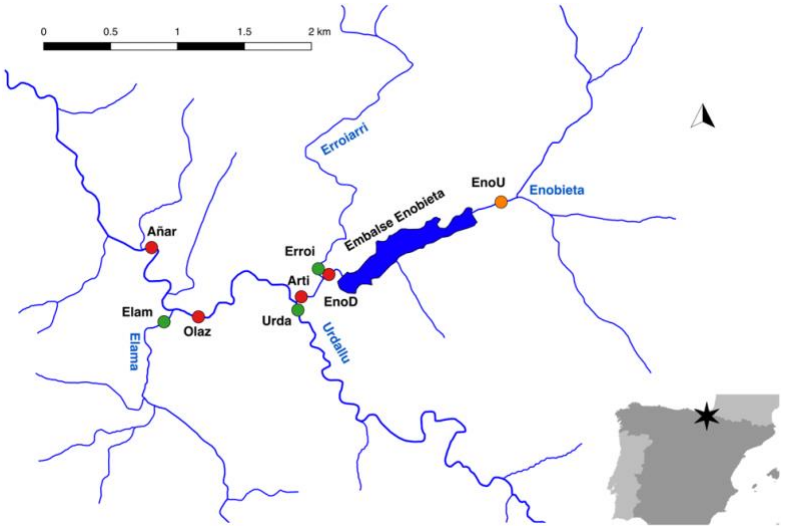
3. Ikerketaren muina eta ondorioak

Gure hipotesiak modu zehatz batean zehazteko, 8 erreka-tarte aztertu ziren guztira: alde batetik, lau kontrol tramu (bat urtegitik gora eta beste hiru urtegiaren eraginik jasaten ez duten ibaiadarretan) eta bestetik, urtegitik behera kokatutako lau inpaktu tramu (1. Irudia). Laginketa-puntuotan uraren kalitatea, ornogabeak eta biofilmaren metabolismoa aztertu ziren hiru fasetan zehar. Hain zuzen ere, urtegia beteta zegoenean (2018, “Beteta”), urtegia hustu bitartean (2019, “Hustuketa”) eta urtegia hustu ondorengo errekuperazio-fasean (2020, “Errekuperazioa”).

a. Uraren kalitatea

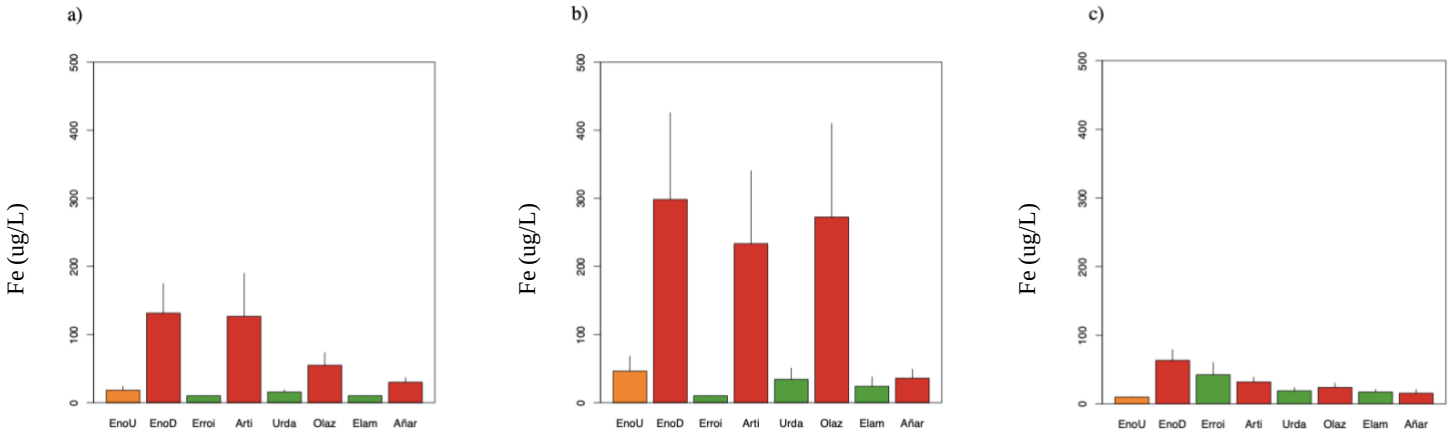
Uraren uhertasuna modu jarraian neurtu zen bi puntutan (Solitax SC, HACH): presapean Artikutza errekan eta Urdallu errekan (kontrola). Honez gain, gutxi gorabehera 8 km beherago kokatuta dagoen eta Gipuzkoako Foru Aldundiko Obra Hidraulikoen departamentuaren jabegokoa den aforo-estazioko uhertasun-datuak ere erabili ziren. Horrela, Añarbeko urtegira garraiatutako sedimentu-kantitatea aztertu ahal izan zen.

Artikutzako arroa bertako uren kalitateagatik nabarmentzen da. Izan ere, inguruko erreka gehienek ez bezala, urak garden mantentzen dira uholde handienetan izan ezik. Hala ere, hustuketa-fasea hastearekin batera, ordura arte urtegian pilatutako sedimentu finen garraioa ere hasi zen, Artikutzan 290 NTU-ko uhertasuna ere lortu zelarik. Hala ere, errekuperazioa hasi ahala, urtegiko sedimentuak egonkortu egin ziren eta berauen garraioa gutxitu. Beraz, presapeko uhertasuna kontrol puntukoaren parera itzuli zen.



1.Irudia. Laginketa-puntuak. Laranjaz, urtegitik gora kokatutako kontrol tramua, gorriz, urtegitik behera kokatutako puntuak (inpaktuak) eta berdez, urtegiaren eragina pairatzen ez duten ibaiadarrak (kontrolak).

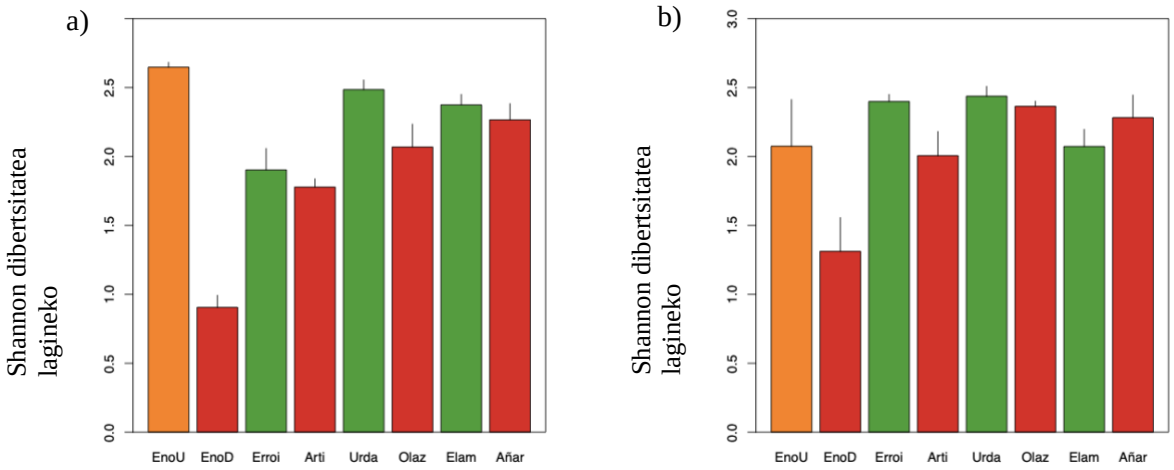
Horrez gain, burdin-kontzentrazioen jarraipena ere egin zen ezarritako 8 laginketa puntuetan. Bertan, filtratu gabeko errekako ura hartu, % 65eko azido nitrikoarekin fixatu, eta ondoren, laborategian, indukzioz akoplatutako plasmaren bidezko masen espektrometria bidez analizatu zen (Fernández-Turiel et al., 2000). Guztira 14 laginketa-saio egin ziren: 7 beteta zegoela, 3 hustuketa bitartean eta 4 errekuperazio-fasean. Kutsatzaile honen jatorria urtegiaren hondoan dago, bertan hipoxia ematen denean disolbatzen baitira metalak. Urtegia beteta egon zen bitartean burdin-kontzentrazio nabarmenak detektatu ziren presapean (2a. Irudia), batez ere EnoD eta Arti estazioetan. Presatik urrundu ahala burdin-kontzentrazioak behera egin zuen nabarmenki, eta Añar estazioko balioak kontrol tramuetakoen antzekoak ziren. Hustuketa-fasean zehar burdin-kontzentrazioak 400 µg/L-tara iritsi ziren (2b. Irudia). Errekuperazio-fasean burdinaren inpaktua ia erabat desagertu zen, eta inpaktuetako balioak kontroletako balioetara hurbildu ziren, kasu guztietan 100 µg/L azpitik mantendu zirelarik (2c. Irudia).



2.Irudia. Uretako burdin-kontzentrazio totalak (µg/L, batezbestekoa ± errore estandarra) Artikutzako sare hidrografikoko zenbait puntuetan a) presa beteta zegoela, b) hustuketa-fasean eta c) errekuperazio-fasean. Laranja eta gorriz adierazi dira ibilgu nagusian kokatutako puntuak. Berdez adierazi dira ibaiadarretako puntuak.

b. Ornogabeak

Makroornogabeak Artikutzako sare hidrografikoko 8 puntuetan lagindu ziren: behin presa beteta zegoela eta beste behin hustuketa-fasean. Estazio bakoitzean 5 lagin hartu ziren Surber sarea erabilita (30 x 30 cm^2-ko azalera eta 0,5 mm-ko zuloak). Hartutako laginak % 70eko alkoholetan fixatuta gorde ziren. Laborategian, laginak 1 mm-ko bahe batetik pasatu eta tamaina horretako makroornogabeak banatu eta identifikatu ziren, kasu gehienetan genero-mailara arte (Tachet et al., 2002). Lortutako datuekin Shannon dibertsitatea kalkulatu zen (Shannon, 1948). Urtegitik gora kokatutako puntuak balio handiena izan zuen (2,6), eta presapeko EnoD puntuan 0,9ra jaisten zen (ANOVA, $F_{7,32}$=27,4, p<0,001) (3a. Irudia). Hustuketa-fasean, urtegian metatutako sedimentuen garraioa zela eta, urtegi azpiko puntuetan dibertsitatea jaistea espero zen arren, ez zen horrelakorik gertatu. Hala ere, presapean oraindik esangarriki txikiagoa izaten jarraitu zuen (ANOVA, $F_{2,32}$=4,2, p<0,01) (3b. Irudia).



3.Irudia. Ornogabe-komunitateen Shannon dibertsitatea (batezbestekoa ± errore estandarra) Artikutzako sare hidrografikoko zenbait puntuetan a) presa beteta zegoela eta b) hustuketa-fasean. Laranja eta gorriz adierazi dira ibilgu nagusian kokatutako puntuak. Berdez adierazi dira ibaiadarretako puntuak.

c. Biofilmaren metabolismoa

Biofilma errekaren hondoan itsatsita hazten den mikrobio-komunitatea da, algaz, bakterioz eta beste hainbat izakiz osatua. Biofilmaren metabolismoa (alegia, fotosintesia eta arnasketa) zehazteko bioentsegu bat diseinatu zen. Laginketa-puntu bakoitzean gutxienez bi hilabetez inkubatutako sei biofilm-eramale (4. Irudia) landan bertan muntatutako laborategira (5. Irudia) eraman eta bertan bi orduz inkubatu ziren *Chu* deritzon disoluzio estandarrean (Andersen, 2005). Estazio bakoitzeko hiru biofilm-eramale 60 mL-ko botila gardenetan inkubatu ziren, eta beste hiru ilunpetan. Ondoren, botila bakoitzeko oxigeno-kontzentrazioa neurtu zen oximetro bat erabiliz (Microsensor NTH-PSt7 on Microx 4, PreSens, Germany).

4.Irudia. Ezkerrean kolonizatu gabeko biofilm-eramalea. Eskuinean, kolonizatutako biofilm-eramalea.

Botila gardenetan neurtutako oxigeno-kontzentrazio aldaketekin biofilmaren ekoizpen garbia kalkulatu zen, eta botila ilunetan neurtutakoekin arnasketa. Azkenik, bi aldagai hauen kenketa eginda, ekoizpen gordina (EPG) kalkulatu zen. Beteta zegoela, urtegiak ez zuen biofilmaren metabolismoan inolako eraginik izan, kontrol eta inpaktuen arteko balioak berdinak baitziren (ANOVA, $F_{1,21}$= 0,47, p>0,05) (6a. Irudia). Hustuketa-fasean zehar ordea, ekoizpenak behera egin zuen nabarmen urtegi azpian (ANOVA, $F_{1,20}$= 5,86, p<0,05) (6b. Irudia). Jaitsiera hustuketan zehar gertatutako sedimentu finen garraioaren ondorio izan zela dirudi. Errekuperazio-fasean, efektu hau erabat desagertu eta inpaktuetako biofilm-komunitateen ekoizpen primarioa berriro ere kontrolen mailara iritsi zen (ANOVA, $F_{1,22}$= 1,55, p>0,05) (6c. Irudia).

5.Irudia. Biofilm-eramaleen inkubazioa burutzeko landan muntatu zen laborategia.

d. Landaredia

Urtegian azaleratutako sedimentuetan hazten hasi zen landaredia 2019tik aurrera aztertu zen. Bertan 54 espezie topatu ziren, haien artean ugarienak *Persicaria* Mill. eta *Juncus* L. generoko landareak zirelarik. Horrez gain, sahats eta haltz landareska ugari ere baziren. 2020an zehar dibertsitatea are gehiago areagotu zen, eta hustuketa-fasean zehar lehenengo azaleratu ziren guneak jada landarediaz guztiz estalita ageri ziren. Beraz, urtegian azaleratutako sedimentuen kolonizazioa azkarra izaten ari da (7. Irudia).

4. Ondorioak

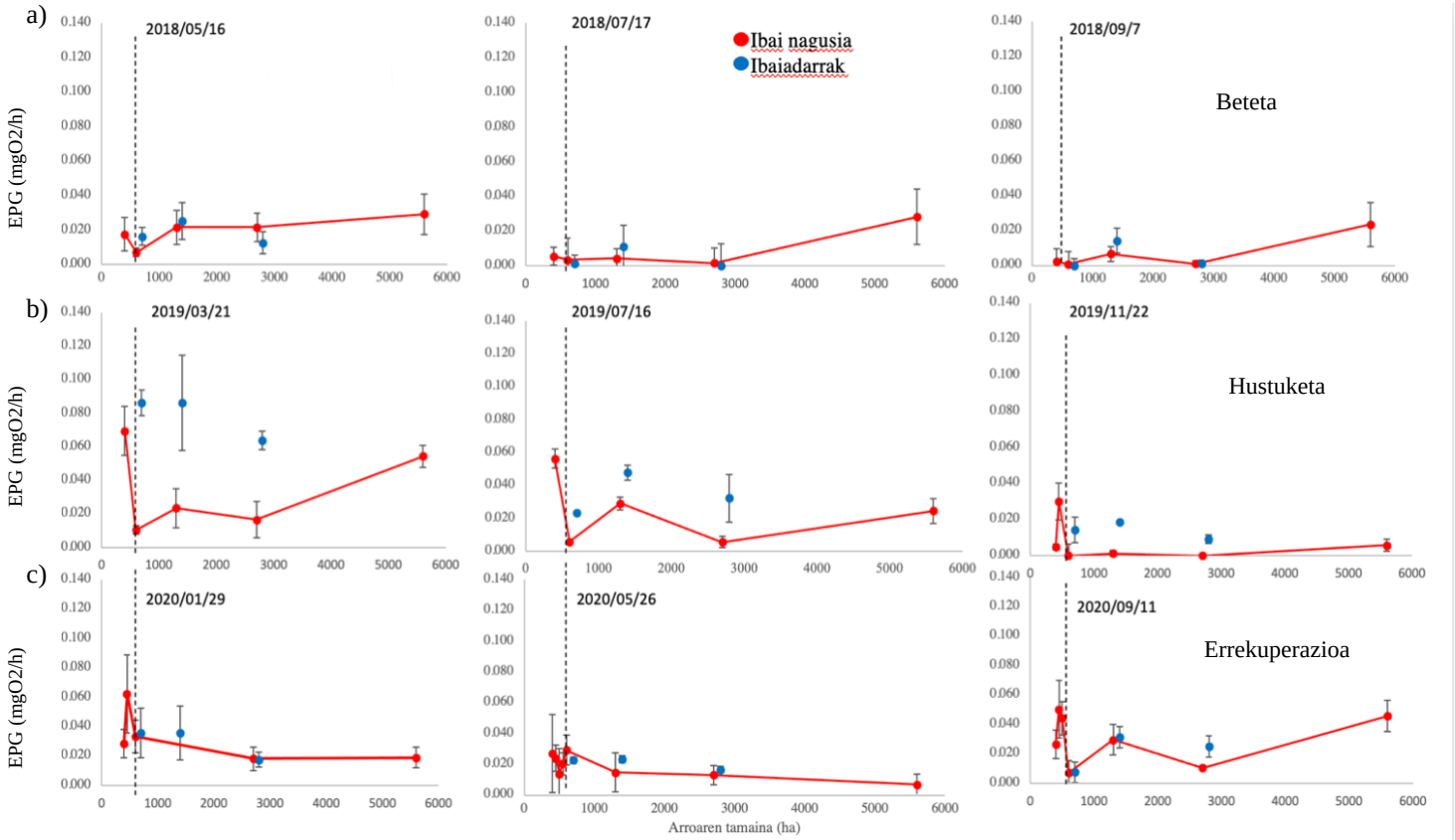
a) Urtegia poliki hustu izanak sedimentuak konpaktatzeko aukera eskaini du, ur behera garraiatutako sedimentuen kantitatea murrituz.

b) Hori dela eta, Enobietako urtegiaren hustuketak ez du efektu ekologiko negatibo handirik izan.
c) Izandako inpaktuak guztiz desagertu dira errekuperazio-fasean.
d) Uraren kalitatea hobetu egin da.
e) Urtegian azaleratutako sedimentuetan landarediaren birkolonizazioa azkarra izaten ari da.

5. Etorkizunerako planteatzen den norabidea

Urtegiek erreka eta ibaietan duten eragin kaltegarriak aski ezagunak diren arren, oraindik ezer gutxi dakigu hauek kentzeak dakarren eraginaz, batez ere urtegi handien kasuan, orain arte egindako ikerketa gehienak tamaina txikiko presak kentzearen ingurukoak izan baitira.

Artikutzako haranean kokatutako Enobieta urtegiaren hustuketak hutsune hori betetzen lagundu dezakeen arren, oraindik ere ikerketa gehiago egin beharko lirateke. Izan ere, Enobietako kasuan ez bezala, leku gehienetan, urtegiaren inpaktu hori ez da ibai-ekosistemetan eragiten duen estresore bakarra izaten, eta bere efektua, uraren eta sedimentuen kutsaduraren, arroaren eta bertako lur-erabileraren edo muturreko gertaera klimatikoak bezalako bestelako eragilerekin elkareragiten egongo da, kasuan kasuko erantzunetan modu desberdinean eragin dezaketelarik. Hori dela eta, urtegi batek erabilgarria izateari uzten dionean, horren eraisketak dituen efektuak aztertzea interesgarria izango litzateke, kasuistika ezberdinetan ibaietako uraren kalitateak eta organismo eta funtzionamenduak ekintza horrekiko duen erantzuna aztertu ahal izateko.



6.Irudia. Biofilmaren ekoizpen primario gordina (mg O_2 h^{-1}, batezbesteko ± errore estandarra), a) presa beteta zegoela, b) hustuketa-fasean eta c) errekuperazio-fasean. Marra eta puntu gorrien bidez ibai-ardatz nagusia adierazi da, eta urdinen bidez ordea, ibaiadarrak adierazi dira.

7.Irudia. Ezkerrean urtegiaren landarediari dagokiola buztanean eman diren aldaketak, eta eskuinean aldiz, urtegiaren erdi aldean emandakoak. Irudiak: Arturo Elosegi.

6. Bibliografia

Aristi I, Arroita M, Larrañaga A, Ponsatí L, Sabater S, von Schiller D, Elosegi A, Acuña V. 2014. Flow regulation by dams affects ecosystem metabolism in Mediterranean rivers. *Freshwater Biology*, 59: 1816-1829.

Andersen RA. 2005. *Algal culturing techniques.* Elsevier Academic Press.

Bellmore JR, Pess GR, Duda JJ, et al. 2019. Conceptualizing Ecological Responses to Dam Removal: If You Remove It, What's to Come? *BioScience*, 69: 26-39.

Brandt SA. 2000. Classification of geomorphological effects downstream of dams. *Catena*, 40: 375-401.

Bushaw-Newton KL, Hart DD, Pizzuto JE, et al. 2002. An integrative approach towards understanding ecological responses to dam removal: the Manatawny Creek study. *Journal of the American Water Resources Association*, 38: 1581-1599.

Fernández-Turiel JL, LLorens JF, López-Vera F, Gómez-Artola C, Morell I, Gimeno D. 2000. Strategy for water analysis using ICP-MS. *Fresenius´ Journal of Analytical Chemistry*, 368: 601-606.

Friedl G eta Wüest A. 2002. Disrupting biogeochemical cycles-Consequences of damming. *Aquatic Sciences*, 64: 55-65.

Maavara T, Chen Q, Van Meter K, et al. 2020. River dam impacts on biogeochemical cycling. *Nature Reviews Earth & Environment*, 1-14.

Muñoz Echabeguren F. 2003. El agua potable en la historia de San Sebastián. *San Sebastián: Aguas del Añarbe.* ISBN:84-607-7900-9.

Nilsson C, Reidy CA, Dynesius M, Revenga C. 2005. Fragmentation and flow regulation of the world's large river systems. *Science*, 308 (80): 405-408.

Orr CH, Kroiss SJ, Rogers KL, Stanley EH. 2008. Benthic downstream responses to small dam removal in a coldwater stream. *River Research and Applications*, 24: 804-822.

Perera D, Smakthin V, Williams S, North T, Curry A. 2021. Ageing water storage infrastructure: an emerging global risk. UNU-INWEH Report Series, Issue 11. United Nations University Institute for Water, Environment and Health, Hamilton, Canada.

Shannon CE. 1948. A mathematical theory of communication. *Bell System Technical Journal*, 27: 379-423.

Tachet H, Richoux Ph, Bournard M, Usseglio-Potalera Ph. 2002. *Invertébrés d´eau douce. Systématique, biologie, ecologie*. CNRS Editions.

Velinsky DJ, Bushaw-Newton KL, Kreeger DA, et al. 2006. Effects of small dam removal on stream chemistry in southeastern Pennsylvania. *Journal of the North American Benthological Society*, 25: 569-582.

Vörösmarty CJ, McIntyre PB, Gessner MO, Dudgeon D, Prusevich A, Green P, Glidden S, Bunn SE, Sullivan CA, Liermann CR. 2010. Global threats to human water security and river biodiversity. *Nature*, 467: 555-561.

Wu H, Chen J, Xu J, Zeng G, et al. 2019. Effects of dam construction on biodiversity: A review. *Journal of Cleaner Production*, 221: 480-489.

Zarfl C, Lumsdon AE, Berlekamp J, Tydecks L, Tockner K. 2015. A global boom in hydropower dam construction. *Aquatic Sciences*, 77: 161-170.

7. Eskerrak eta oharrak

Eskerrak eman nahi dizkiet bereziki, hiru urte hauetan zehar edozein ezustekoren aurrean beti laguntzeko prest egon diren Artikutzako udal langileei eta baita, laguntza behar izan dugunean esku bat botatzeko prest agertu diren ikasle zein lankideei. Azkenik, eskerrak eman nahi dizkiet Euskal Herriko Unibertsitateari (UPV/EHU), doktoretza aurreko bekagatik eta “Fundación BBVA”ri 064_17 “DESEMBALSE” proiektua diruz laguntzeagatik.

Erretikulu endoplasmatikoaren eta Mitokondriaren arteko konexioek mtDNA-ren erreplikazioan duten inplikazioa

Lopez de Arbina, A.[1], Osinalde, N.[5] eta Holt, I.[1,2,3,4]

(1) *Neurozientziak arloa, OII Biododonostia, Donostia, Gipuzkoa., (2) Mugimendu-neurozientzien eta klinikoen departamentua, UCL Queen Square Neurologia Institutoa, Royal Free Kanpusa, Londres, Erresuma batua., (3) Ikerbasque, Basque Foundation for Science, Bilbo, Espainia.,(4) Cibernet, Centro Investigación Biomédica en Red Enfermedades Neurodegenerativas, Zientzia eta Berrikuntza ministeritza, Carlos III osasun institutoa, Madril, Espainia., (5) Biokimika eta Biologia Molekularra saila, Farmazia Fakultatea, Euskal Herriko Unibertsitatea, UPV-EHU, Gasteiz, Araba*

amaia.lopezdearbina@biodonostia.org

Laburpena

Zelulako atal desberdinen arteko komunikazioa eta koordinazioa organuluen arteko konexio fisikoek gobernatzen dute. Mitokondria, elikagaietatik energia sortzen duen organulua, eta erretikulu endoplasmatikoa (EE), glukosaren metabolismoa erregulatzen duena, estuki erlazionatuta daude. EE-mitokondria lotuneek berebiziko garrantzia daukate zelularen ongizatean. Besteak beste, lotune horiei esker mitokondriako DNA (mtDNA) erreplikatu eta segregatu daiteke, mitokondriek energia ekoizteko ezinbestekoa dena. Ondorioz, lotuneak kaltetua daudenean, gaitz ezberdinak garatzen dira, esaterako neuroendekapenezko gaixotasunak. Artikulu honen helburua EE-mitokondria lotuneetan parte hartzen duten proteinak zeintzuk diren identifikatzea da, horren inguruan ikertzeak EE-mitokondria lotuneetako akatsek neuroendekapenean eta zahartzapenean duten eragina ulertzen lagunduko baitigu.

Hitz gakoak: Erretikulu endoplasmatikoa, mitokondria, mtDNA, lotuneko proteinak

Abstract

Communication and coordination between the different parts of the cell is dependent on physical connections between organelles. Mitochondria, the organelles that produce energy from food, and the endoplasmic reticulum (ER), which regulates glucose metabolism, are closely connected. Aberrant mitochondrial-ER contact sites have been detected in neurodegenerative disorders, thereby suggesting that these are medically as well as biologically important structures. A key function of the contact sites is to permit replication and segregation of the DNA in the mitochondria, without which mitochondria cannot produce energy. The aim of this article is to identify the proteins involved in EE-mitochondria junction, as it would help us understand how impairment of EE-mitochondria junctions contributes to neurodegeneration and aging.

Keywords: Endoplasmic reticulum, mitochondria, mtDNA, junction proteins

1. Sarrera eta motibazioa

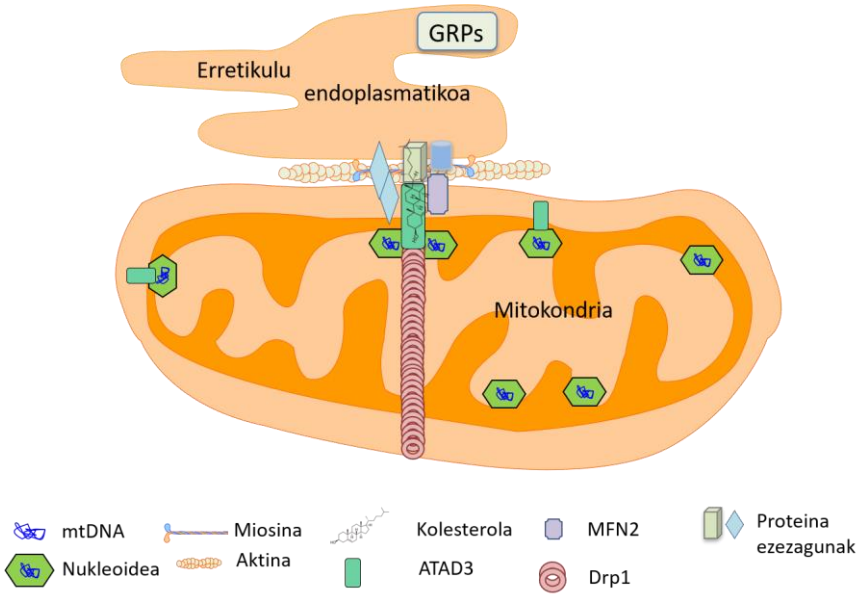
Zelulen funtzionamendu egokiak osasuna eta bizi-itxaropena bermatzen du. Hain zuzen ere, zelulako betebehar bakoitza ondo gauza dadin, zelulako konpartimentu edo organulu bakoitza funtzio multzo batean espezializatua dago. Zelulako funtzio guztiak koordinatuta egon behar direnez, konpartimentuen arteko komunikazioa eta seinaleztapena ezinbestekoa da zelularen biziraupenerako. Hori horrela, organuluen arteko konexio akatsdunek gaixotasunetan, batez ere neuroendekapenezkoetan duten eragina dela eta, biologiako arlo honetan interes handia piztu da azken hamarkadan (Mueller et al., 2016).

Konexio intrazelularren artean mitokondria (MT) eta erretikulu endoplasmatikoaren (EE) artekoa da momentuz gehien ezagutzen dena (Rowland et al., 2012; Gomez-Suaga et al., 2017; De Vos et al., 2012; Theurey et al., 2017). MTek ezinbesteko funtzio bat betetzen dute; zelula energiaz hornitzea. Horretarako, funtsean, elikagaietatik eskuratzen diren biomolekulak (batez

ere azukreak eta lipidoak) eta arnasten dugun oxigenoa erabiltzen dute. Era berean, EEak glukosa homeostasian ezinbesteko funtzioa dauka, eta ondorioz, glukosari erantzuten dioten proteinen (GRP, *glucose responsive proteins*) egoitza nagusia da. Hortaz, EE-MT arteko konexioek zelulako glukosaren metabolismoa koordinatua egotea ahalbidetzen dute (Theurey et al., 2017).

Mitokondria eta erretikulu endoplasmatikoaren arteko lotura fisikoak "mitokondriei asoziaturiko EE mintzak" bezala edo MAM (*mitochondria-associated ER membranes)* laburduraz ezagutzen dira. MAMak lipidoen trukean ezinbesteko funtzio betetzen dute (Vance, et al., 1990). Horrez gain, Ca^{2+}-aren garraioaeta mitokondriaren fusio eta fisio dinamikak erregulatzen dituzte *dynamin related protein 1* (Drp1) eta zitoeskeletoko aktina-miosina proteinen bitartez (Garrido et al., 2003; Iborra et al., 2004). Hain zuzen ere, fusio-fisio dinamikak erregulatzeak mtDNA segregazioa, hau da, mtDNA mitokondria guztietan egokiro sakabanatzea ahalbidetzen du. Testu liburu askotan agertzen denaren kontra, mtDNA ez dago mitokondriako matrizean solte, mitokondriaren barne mintzari atxikitua baizik (Nass et al., 1969). Atxikimendu hori gauza dadin kolesterola, ATAD3 proteina eta esfingolipidoak beharrezkoak dira (Gerhold, et al., 2015). Lotura horren arrazoia guztiz ulertzen ez bada ere, badakigu zahartzearekin batera atxikimendu hori galduz doala, eta neuroendekapenezko gaixotasunak garatzen direla (Mueller et al., 2016) (1. Irudia).

1. irudia. EE-MT lotura guneen adierazpen grafikoa



Mitokondrien energia ekoizpena zitoplasmako faktoreen mende badago ere, mitokondriako DNAk kodetzen dituen 13 proteinak ere ezinbestekoak dira. Horregatik, MT-EE loturen arteko desoreka edota organuluen arteko komunikazio akatsek mtDNAan duten eraginagatik gaixotasun desberdinak garatzen dira. Akats horiek edozein zelula edo ehunetan gerta badaitezke ere, batez ere gaixotasun neurologikoak eragiten dituzte. Izan ere, adinarekin batera mitokondrien gutxipena eta mtDNA-ren funtzio galera gertatzen dela ikusi da (Kraytsberg Et al., 2006), eta horrek adinarekin erlazionaturiko gaitzetan, bereziki neuroendekapenean eragina dauka (Bender et al., 2006; Gonzalez-Freire et al., 2015; Bubber et al., 2005).

2. Ikerketaren helburuak

Mitokondriak, zelulako energia ekoizle nagusiak, DNA zirkular txiki bat dauka, besteak beste energia ekoizteko ezinbestekoak diren entzimak kodetzen dituena. mtDNA-n atzemandako akatsak

zahartzapenarekin eta hainbat giza gaitzekin erlazionatu da, mtDNA-k zelularen homeostasian duen garrantzia azaleraziz. mtDNA-ren mantenu egokia bermatzeko, mtDNA erreplikatu egin behar da. Oso modu finean erregulatuta dagoen prozesu horretan zelulako beste organulu batzuk ere parte hartzen dute, adibidez erretikulu endoplasmatikoak.

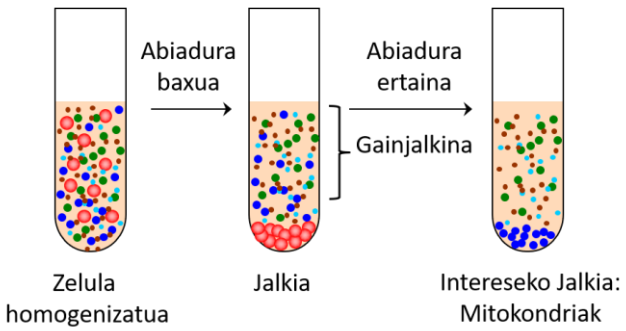
Badago proteina sorta jakin bat oso modu ordenatuan antolatzen dena, EE-MT konexioa bideratzen duen egitura osatzeko, "Mitokondriei Asoziaturiko EE Mintza" (MAM) hain zuzen. Erreplikatzen eta segregatzen den mtDNA egitura zehatz horren parte denez, EE-mitokondria konexio guneetako proteinetan asaldurak gertatzen direnean mtDNA-n anormaltasunak gertatzen dira, eta horrek gaixotasunen garapena bultzatzen duten zelula mailako akatsak eragiten ditu. Testuinguru horretan, hemen proposatzen den ikerketa lanaren **helburu nagusia** **EE-mtDNA kontaktu guneen egitura eta funtzioa zein den argitzea da.**

3. Ikerketaren muina

3.1. EE-mtDNA lotura guneetako proteinen purifikazioa

mtDNA-ri loturiko proteinak identifikatzeko, lehenik eta behin purifikatu egin behar dira. mtDNA-ri loturiko proteinak saguen bihotzeko eta gibeleko ehunetik purifikatu dira aurretiaz laborategian diseinaturiko zentrifugazio diferentzialeko protokolo bat erabiliz (Reyes et al., 2011) (2. irudia). Zentrifugazio diferentziala eraginkorra izan dadin, lehenik eta behin ehuna xehetu behar da soluzio homogeneizatua lortu arte, eta ondoren, abiadura baxuan (600g) zentrifugatu. Horrela, pisu handiena duten zelulako organuluak (nukleoa eta zitoeskeletoa) jalkiko dira, eta gainjalkinean pisu baxuko organuluak (besteak beste mitokondriak) geratuko dira. Azkenik, gainjalkin hori abiadura ertaina erabiliz (9000g) zentrifugatzen da mitokondriak jalki daitezen. Jalkin horretan mitokondriak ez ezik, peroxisomak eta lisosomak ere egongo dira.

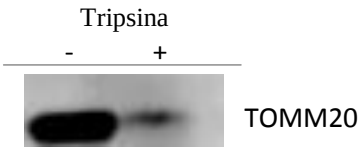
2. Irudia. Ehunetik abiatuta, zentrifugazio diferentzialaren bitartez, mitokondrietan aberatsa den frakzioa lortzen da.



Purifikazio prozesu ororen helburu nagusienetako bat proteina kutsatzaileen purifikazioa ekiditea da. Ikerlan honen helburua EE-MT konexiotako proteinak identifikatzea denez, esaterako mitokondrietako kanpo mintzean dauden proteinak ez dira interesgarriak. Horren arira, berriki frogatu da mitokondriak tripsina proteasarekin tratatuz gero, mitokondrien kanpo mintzeko proteinak (adb. TOMM20), eta ohiko proteina kutsatzaileak (adb. histonak) oso modu eraginkorrean deuseztatzen direla. Horregatik, behin zentrifugazio diferentzial bidez mitokondrietan aberatsa den frakzioa lortuta, lagin hori tripsinarekin tratatu da.

Tratamenduaren eraginkortasuna frogatzeko, mitokondrien kanpokaldean kokatzen den TOMM20 proteina detektatzen da TOMM20 ezagutzen duen antigorputz espezifiko bat erabiliz. 3. irudian ikus daitekeen bezala, tripsinarekin tratatu gabeko laginean TOMM20ren presentzia oso nabarmena da eta, aitzitik, tripsinarekin tratatutako laginean bere seinalea askoz ere apalagoa da. Horrek erakusten du tripsina bidezko tratamendua egokia dela ikerketa honetan interesatzen ez zaizkigun proteinak, besteak beste mitokondrietako kanpo mintzekoak deuseztatzeko.

3. Irudia. TOMM20 proteinaren detekzioa mitokondrietan aberatsak diren laginetan.

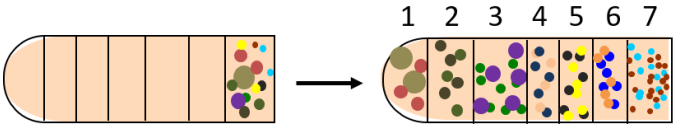


Behin kutsatzailerik gabeko mitokondrietan aberatsa den frakzioa lortuta, mitokondriak DDM detergentearekin lisatzen dira barruko proteinak kanporatzeko.

Mitokondriak bi mintz ditu: kanpo mintza eta barne mintza. Detergenteen presentzian, mintzen gehiengoa lisatzea lortzen da. Halere, MT-EE konexio guneetako MAMak lipidotan, eta zehazki kolesterol eta esfingolipidotan aberatsak direnez, detergenteekiko erresistentea dira, eta ez dira lisatzen.

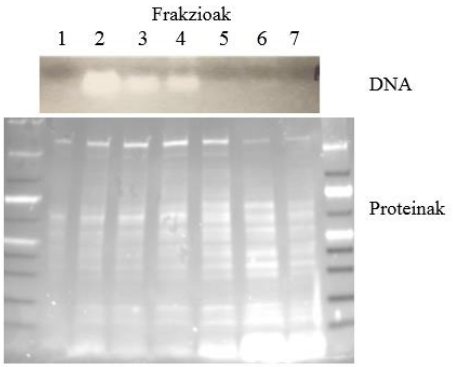
MAM osatzen duten proteinen identitatea ezagutu nahi denez, mitokondrietan aberastutako laginean proteinak MAMetatik banandu behar dira. Helburu hori lortzeko, dentsitatezko gradiente baten zentrifugazioa egin da. Hasteko, dentsitate desberdineko geruzak sortu dira Iodixanol dentsitate handiko soluzioaren disoluzio ezberdinak prestatuz (%37,5 saiodiaren behealdean - %25 saiodiaren goialdean). Gradiente hori abiadura handian ultrazentrifugatzerakoan (100.000g), tamaina desberdineko makromolekulak abiadura desberdinetan jalkitzen dira gradientearen puntu desberdinetan. Jalkitze abiadura, indar zentrifugoaz gain, makromolekulen tamaina, forma eta gradientearen dentsitatearen mendekoa da. Horregatik, teknika horren bidez, makromolekulak tamainaren arabera banatzen dira; handienak saiodiaren behealdean, eta txikienak goialdean (4.irudia).

4. Irudia. Zentrifugazio diferentzialaren ostean jalki den lagina dentsitate desberdinetan banatzeko prozesu eskematikoa.



Zentrifugazio diferentzialaren ostean, bereiztutako 7 frakzioetatik mtDNA zeinetan edo zeintzutan dagoen detektatzeko, frakzio bakoitzeko lagin bana hartu, eta argi ultramorepean behatu da. 6. Irudian ikus daitekeen bezala, mtDNA 2-4 frakzioetan dago. Bestalde, proteinen tindatzaile ez-espezifiko bat erabiliz ikus daiteke, proteinak frakzio guztietan daudela (5. Irudia).

5.irudia. mtDNA eta proteinen detekzioa Iodixanol gradientetik lorturiko frakzioetan



Lan honen helburu nagusia mtDNA-EE proteinak identifikatzea denez, mtDNA gehien duen frakzioa (2. frakzioa) EE-mtDNA konexioko proteinak (*EEproteinak*) analizatzeko erabili da, eta aldiz, mtDNA-rik ez edo gutxi duen frakzioa (7. frakzioa) *kontrol* moduan.

3.2. EE-mtDNA lotura guneetako proteinen identifikazioa

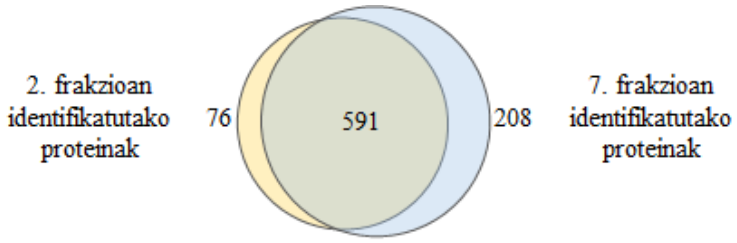
CIC bioGUNE-ko proteomikako zerbitzuarekin kolaborazioan, masa espektrometria bidez, EE-mtDNA lotura guneetako proteinak identifikatzeko lehen saiakera egin da. Zehazki bi lagin aztertu dira; iodixanol gradientetik lortutako 2. eta 7. frakzioak.

2. frakzioan mtDNA-EE lotura guneetako proteinak egon beharko lirateke, eta 7.frakzioan berriz ez. Hori dela eta, 7. Frakzioa kontrol gisa erabili da. Bi laginetako proteinak FASP metodoa jarraituz digeritu dira, eta lortutako peptido-nahasketa alderantzizko kromatografia likido bidez banatu ahala, TIMS masa espektrometroan analizatu dira. Masa espektrometroak peptido-ioien masa-karga (m/z) neurtzen du, eta horren arabera banatzen ditu (MS espektroa). Peptido ugarienak gainerakoetatik isolatzen ditu, eta zatikatu egiten ditu fragmentazio-espektroak osatzeko. Konputazio-erraminta bereziak erabiliz, masa espektrometroek bildutako datu guztiak (peptidoen m/z eta fragmentazio-espektroetan gordetako informazioa) datubase baten aurka konparatzen dira, eta horrela jakiten da zeintzuk diren aztertutako laginean dauden proteinen identitatea (6. Irudia).

6. irudia. mtDNA-EE lotura guneko proteinen identifikaziorako prozedura

Gaur gaurkoz, frakzio bakoitzeko bana lagin aztertu dira 7. irudian adierazitako prozedura erabiliz, baina gure hurbileko helburua kopuru hori handitzea da. Egindako analisian, 667 proteina identifikatu dira 2. frakzioan, eta 799 proteina 7. frakzioan. Bi laginetan identifikatutako proteinak konparatuz, proteina gehienak (591) bi frakziotan detektatu direla ikus daiteke (7. Irudia). Halere, nabarmentzekoa da 2. frakzioan 7. frakzioan detektatu ez diren 76 proteina atzeman direla. Kontuan izanda 2. frakzio horretan mtDNA-EE lotura guneetako proteinak daudela eta 7. frakzioan ez, soilik 2. frakzioan identifikatutako proteina horiek aztertuko dira.

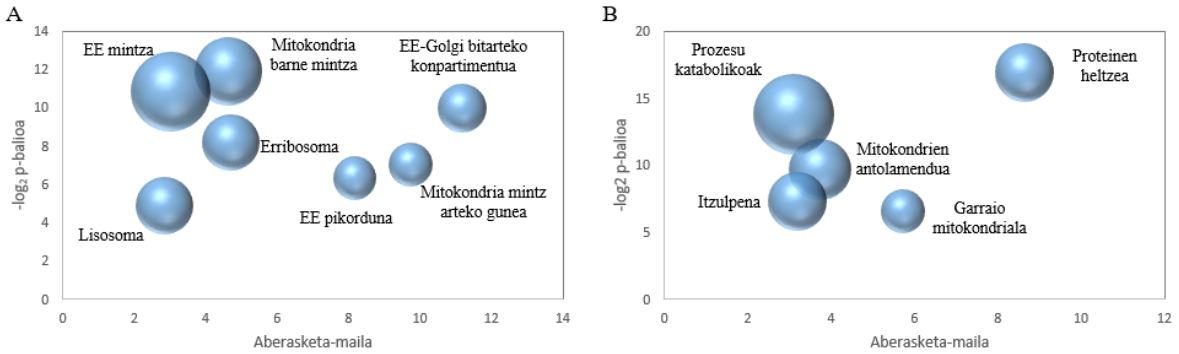
7. irudia. 2. Eta 7. Frakziotan identifikatutako proteinen konparaketa erakusten duen Venn diagrama



Bakarrik 2. frakzioan identifikatutako proteinen izaera zehazteko, gene-ontologiaren analisia egin da DAVID deituriko programa erabiliz (He J. et al., 2012). Horrela finkatu dira zeintzuk diren genoma osoarekin alderatuz, esklusiboki 2. frakzioan detektaturiko proteinen artean aberastutako zelula-osagaiak eta biologia-prozesuak. 8a irudian ikus daitekeen bezala, identifikaturiko proteina gehienak EEko eta mitokondriako proteinak dira, besteak beste EEko mintzekoak, EE pikordunekoak,

mitokondriako barne mintzekoak eta mitokondriako mintz arteko gunekoak. Izan ere, 8b irudian ikus daiteke intereseko proteinek mitokondria eta EEko prozesu garrantzitsuetan hartzen dutela parte, hala nola prozesu katabolikotan, mitokondrien garraio eta antolamenduan, proteinen itzulpenean eta heltze-prozesuan.

8. irudia. Esklusiboki 2. Frakzioan identifikaturiko proteinen artean modu esanguratsuan (p-balioa<0.05) aberastuta dauden hainbat (A) zelula-osagai eta (B) biologia-prozesu.



4. Ondorioak

Mitokondriaren DNA erreplikatzeko eta segregatzeko mitokondriei asoziaturiko EE mintza (MAM) osatzen duten proteinak identifikatze-prozesuan aurrera pauso handiak eman dira proiektu honetan. Ehun biologikotatik abiatuta mitokondriak purifikatzeko pausuak optimizatu ditugu. Horri esker, behin mitokondriak isolatuta, proteina kutsatzaileak ekiditeko tripsinaren erabilera oso modu eraginkorrean erabili da, eta besteak beste, mitokondrien kanpo mintzeko TOMM20 proteina deuseztatzea lortu da.

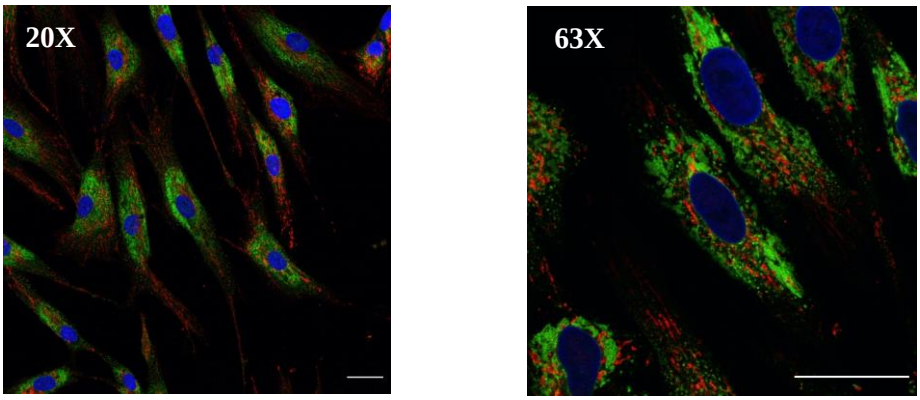
Masa espektrometriako emaitzak, nahiz eta behin behinekoak izan, oso itxaropentsuak dira. Izan ere, mtDNA-dun iodixanolezko frakzioan kontrolean identifikatu ez diren hainbat proteina interesgarri identifikatu dira. Gene ontologiako analisiak erakusten du proteina horietako asko mitokondria eta EEkoak direla, eta ondorioz, bi organulu horietako prozesu gakotan parte hartzen dutela.

5. Etorkizunerako planteatzen den norabidea

EE-MT lotura guneetako proteinen identitatea analizatzen jarraituko dugu masa espektrometria (MS) bidez erreplika gehiago aztertuz. Horrez gain, MS bidez lortutako emaitzak antigorputz bidezko detekzio teknikak erabiliz berretsiko ditugu, eta intereseko proteinaren bat detektatzeko antigorputzik existitzen ez bada, proteomika ituratura joko dugu balidazioa gauzatzeko.

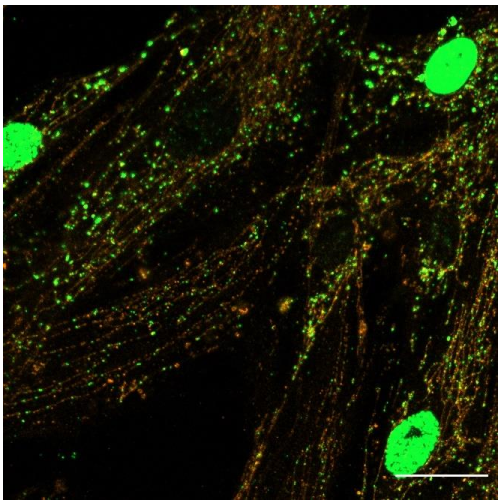
Behin EE-MT lotura guneetako proteinak identifikatu eta balidatu ostean, proteina horien gehiegizko presentziak edo ausentziak zeluletan, eta bereziki EE-MT konexio guneetan daukaten eragina aztertuko da inmunozitokimika bidez (9.irudia). Zehazki, zelulen nukleoak, EE, eta MTak kolore ezberdinekin markatuko dira, organuluen morfologia bereiztu ahal izateko.

9.irudia. Fibroblastoen markaketa DAPI (nukleo markatzailea, urdina), KDEL (EE markatzailea, berdea) eta TOMM20 (MT markatzailea, gorria) erabiliz.



Arestian esan bezala, mtDNAren erreplikazioa egokia izan dadin, MAM konplexua ezinbestekoa da (Bubber et al., 2005). Hori dela eta, MAMen osagaiak mtDNAren biologian daukaten eragina ere aztertuko da. Horretarako, aurrez MS bidez identifikatutako MAM osagaiak gainadierazi edo isilarazi egingo dira zeluletan, eta mtDNA markatu egingo da, adibidez bromo- deoxiuridina (BrdU) antigorputzarekin. DNA erreplikatu ahala BrdU DNAn inkorporatzen denez, oso teknika erabilgarria da DNAren sintesia kuantifikatzeko. Zelulako DNAren %99 nukleoan dago, eta horregatik nukleoko seinalea oso intentsoa da (10. Irudia). Aldiz, mtDNA DNA guztiaren %1 baina gutxiago da, eta mitokondrien sarean zehar ikusten diren puntu berdeak dira (10.irudia).

10.irudia. Fibroblastoen markaketa BrdU (DNA, berdea) eta TOMM20 (MT, gorria) antigorputzak erabiliz.



6. Erreferentziak

Bender, A., Krishnan, K. J., Morris, C. M., Taylor, G. A., Reeve, A. K., Perry, R. H. eta Turnbull, D. M. (2006), High levels of mitochondrial DNA deletions in substantia nigra neurons in aging and Parkinson disease. *Nature genetics*, *38*(5), 515-517.

Bubber, P., Haroutunian, V., Fisch, G., Blass, J. P., & Gibson, G. E. (2005), Mitochondrial abnormalities in Alzheimer brain: mechanistic implications. *Annals of Neurology: Official Journal of the American Neurological Association and the Child Neurology Society*, *57*(5), 695-703.

De Vos, K. J., Morotz, G. M., Stoica, R., Tudor, E. L., Lau, K. F., Ackerley, S. eta Miller, C. C. (2012), VAPB interacts with the mitochondrial protein PTPIP51 to regulate calcium homeostasis. *Human molecular genetics*, *21*(6), 1299-1311.

Paillusson, S., Stoica, R., Gomez-Suaga, P., Lau, D. H., Mueller, S., Miller, T., & Miller, C. C. (2016), There's something wrong with my MAM; the ER–mitochondria axis and neurodegenerative diseases. *Trends in neurosciences*, *39*(3), 146-157.

Gerhold, J. M., Cansiz-Arda, Ş., Lõhmus, M., Engberg, O., Reyes, A., Van Rennes, H., eta Spelbrink, J. N. (2015), Human mitochondrial DNA-protein complexes attach to a cholesterol-rich membrane structure. *Scientific reports*, *5*(1), 1-15.

Gonzalez-Freire, M., De Cabo, R., Bernier, M., Sollott, S. J., Fabbri, E., Navas, P., eta Ferrucci, L. (2015), Reconsidering the role of mitochondria in aging. *Journals of Gerontology Series A: Biomedical Sciences and Medical Sciences*, *70*(11), 1334-1342.

He, J., Cooper, H. M., Reyes, A., Di Re, M., Sembongi, H., Litwin, T. R., ... & Holt, I. J. (2012), Mitochondrial nucleoid interacting proteins support mitochondrial protein synthesis. *Nucleic acids research*, *40*(13), 6109-6121.

Sherman, B. T., & Lempicki, R. A. (2009), Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nature protocols*, *4*(1), 44.

Iborra, F. J., Kimura, H., & Cook, P. R. (2004). The functional organization of mitochondrial genomes in human cells. *BMC biology*, *2*(1), 1-14.

Kraytsberg, Y., Kudryavtseva, E., McKee, A. C., Geula, C., Kowall, N. W., eta Khrapko, K. (2006), Mitochondrial DNA deletions are abundant and cause functional impairment in aged human substantia nigra neurons. *Nature genetics*, *38*(5), 518-520.

Nass, M. M. (1969), Mitochondrial DNA: I. Intramitochondrial distribution and structural relations of single-and double-length circular DNA. *Journal of molecular biology*, *42*(3), 521-528.

Rowland, A. A., eta Voeltz, G. K. (2012), Endoplasmic reticulum–mitochondria contacts: function of the junction. *Nature reviews Molecular cell biology*, *13*(10), 607-615.

Theurey, P., eta Rieusset, J. (2017), Mitochondria-associated membranes response to nutrient availability and role in metabolic diseases. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, *28*(1), 32-45.

Vance, J. E. (1990), Phospholipid synthesis in a membrane fraction associated with mitochondria. *Journal of Biological Chemistry*, *265*(13), 7248-7256.

7. Eskerrak eta oharrak

Eskerrak nire lankidei lan honetan emandako laguntza guztiagatik. Eskerrik asko Hanss eta Antonella mitokodriak isolatzeko protokoloa erakusteagatik eta zuen aholku guztiengatik. Azkenik, eskertu baita OII Biodonostia, Euskal Herriko Unibertsitatea eta Eusko Jaurlaritza, lan hau gauzatzeko diru laguntzagatik.

ATAD3 gene-familian *de novo* duplikazioek Harel-Yoon sindromea sortzen dute, eta kolesterolaren eta mitokondrien metabolismoan kalteak eragiten dituzte

Muñoz-Oreja, M.[1,2], Gunning, A.[3,4], Fernandez-Pelayo, U.[1], Durigon, R.[5], Spinazzola, A.[5], Ellard, S.[3,4], Holt, I.[1,5,6,7]

(1) Neurozientziak arloa, Biodonostia Osasun Ikerketa Institutoa, Donostia, Espainia., (2) Pediatria saila, Donostiako Irakasgunea, Medikuntza eta Erizaintza Fakultatea, Euskal Herriko Unibertsitatea, EHU, Donostia, Espainia., (3) Exeter Laborategi Genomikoa, Royal Devon eta Exeter NHS Foundation Trust, Exeter, Erresuma Batua., (4) Zientzia Biomediko eta Klinikoen Institutoa, Medikuntza eta Osasun Fakultatea, Exeter Unibertsitatea, Exeter, Erresuma Batua., (5) Mugimendu-neurozientzien eta klinikoen departamentua, UCL Queen Square Neurologia Institutoa, Royal Free Kanpusa, Londres, Erresuma Batua., (6) Ikerbasque, Basque Foundation for Science, Bilbo, Espainia., (7) Ciberned, Centro Investigación Biomédica en Red Enfermedades Neurodegenerativas, Zientzia eta Berrikuntza Ministeritza, Carlos III Osasun-Institutoa, Madril, Espainia.

mikel.munoz@biodonostia.org

Laburpena

Lan honetan ATAD3 lokusean *de novo* duplikazio berri bat identifikatu da Harel-Yoon sindromea sortzen duena. Duplikatutako sekuentziak analizatuz ikusi dugu duplikazioa ziurrenik errekonbinazio homologo ez-aleliko bidez gertatu zela. Hori dela eta sortutako sekuentziak ATAD3A-C gene-fusio bat sortzen du, zeinaren proteinak funtzio egokirako aminoazido gako batzuk falta dituen. Gaixoen zeluletan ikusi ahal izan dugu proteina-fusioa adierazi egiten dela eta zelula-barneko kokapen egokia duela. Gainera, baieztatu dugu zelulek kolesterolean eta mitokondrietako DNAn alterazioak dituztela, ATAD3n bestelako aldaketa genetikoak dituzten gaixoen antzera. Beraz, gure emaitzek gaixotasun horren diagnosi molekular baterako hastapenak markatzen dizkigute, eta Harel-Yoon sindromearen espektro genotipiko eta fenotipikoa zabaltzen dute.

Hitz gakoak: ATAD3, duplikazio, mtDNA, Harel-Yoon sindromea, kolesterola.

Abstract

In this work a new de novo duplication at the ATAD3 locus was identified which causes Harel-Yoon syndrome. Analysis of the duplicated sequences indicate that they were likely mediated by non-allelic homologous recombination. The duplicated sequence produces an ATAD3A-C fusion gene whose protein product lacks key functional amino acids. Analysis of patients' cells shows that the fusion gene product is expressed and maintains its native subcellular location. Furthermore, these cells display perturbed cholesterol and mitochondrial DNA organization similar to that observed for individuals with other ATAD3 rearrangements. Therefore, our data delineate a molecular diagnosis for this disorder and extend the genotypical and phenotypical spectrum associated with Harel-Yoon syndrome.

Keywords: ATAD3, duplication, mtDNA, Harel-Yoon syndrome, cholesterol.

1. Sarrera eta motibazioa

Mitokondriak giza zelula guztietan daude eta zelulen "zentral energetiko" bezala ere ezagutzen dira. Hala da euren funtzio behinenetako bat delako zelula behar duen energiaz hornitzea; horretarako, funtsean, elikagaien liseriketaren produktuez eta arnasten dugun oxigenoaz baliatuz. Prozesu horri zelulen arnasketa esaten zaio. Mitokondriak bi mintzez inguraturiko egitura biribil edo obalatuak dira, eta mintz horiek berebiziko garrantzia dute, besteak beste, barne-mintzean gertatzen delako energiaren sintesia. (Becker et al., 2006; Sastre et al., 2009).

Mitokondrietan gertatzen den energiaren sintesia funtsezkoa da zelulako prozesu ia guztiak bete ahal izateko energia behar delako. Hortaz, ezgaitasun mitokondrialak energiaren krisi larriak dakartza eta hainbat giza gaixotasunen sorrera, bereziki, gaixotasun neurologikoena (Di

Mauro eta Schon, 2008). Gaixotasun mitokondrialen azpitalde garrantzitsu bat DNA mitokondrialean (mtDNA) gertatzen diren akatsen ondoriozko gaixotasunek osatzen dute. mtDNA nukleotik fisikoki bereizita badago ere, nukleoaren beharra du bertako material genetikoak kodetzen dituen 200 produktu geniko baino gehiago mitokondrien mantenu eta adierazpenerako behar direlako. Beraz, nukleoko zenbait genetan gertatzen diren aldaketa genetikoek ere mtDNA-n anomaliak sor ditzakete (Gorman et al., 2016).

Nukleoan kodetzen den baina mitokondrioetan eragina duen proteina horietako bat, ATAD3 da. Gene-familia horretan aldaketa eta birkonbinazio genetiko askotarikoak deskribatu diren arren, horien ondorioz sortzen diren fenotipo zelularrak antzekoak dira, eta fenotipo klinikoak aterki zabal baten barruan biltzen dira, Harel-Yoon sindrome izenpean (Harel et al., 2016).

ATAD3 gene-familia elkarren artean oso antzekoak diren hiru genez osatua dago: ATAD3A, ATAD3B eta ATAD3C. ATAD3A eta ATAD3B geneen sekuentziak ia identikoak dira, baina duten desberdintasun bakanetariko baten ondorioz, sekuentzia horietatik sortzen diren proteinetan ATAD3B 62 aminoazido luzeagoa da. ATAD3C-ren sekuentziak, ostera, ez da ikusi proteinarik kodetzen duenik (Harel et al., 2016; Desai et al., 2017). Badakigu, ATAD3 proteinak sintetizatzean, euren artean batzen direla eta hexamero izeneko sei ATAD3-zko proteina-talde handiagoak osatzen dituztela, zeluletako mitokondrien bi mintzak zeharkatuz kokatzen direnak (Gilquin et al., 2010). Mitokondrien mintzetan, ikusi da ATAD3-k harremana duela mtDNA-rekin eta bere erreplikazio eta transkripzio prozesuetan parte hartzen duten hainbat proteinekin, mitokondrien zatiketan diharduten zenbait proteinekin, eta baita kolesterolaren metabolismoarekin erlazionaturiko mitokondrietako proteina batzuekin ere. Gainera, ikusi izan da ATAD3 proteinan akatsek edo gabeziek askotariko aldaketak dakartzatela mitokondrien egituran eta funtzioan, esaterako, *Drosophila melanogaster* eulian bor ATAD3A-ren gene homologoa da eta bor-en aldaketa genetikoak mitokondria kopuruaren gutxitzearekin eta mitokondrien aldaketa estrukturalekin erlazionatu dira (Harel et al., 2016; Desai et al., 2017; Cooper et al., 2017). Hala ere, ez dago argi ATAD3-ren ondorio diren, zuzenean (Baudier, 2018; Peralta et al., 2018), ala kolesterol-aldaketek mitokondrien mintzetan sortzen dituzten gora beheren ondorio (Issop et al., 2015; Desai et al., 2017), edo bien arteko zeozer.

2. Arloko egoera eta ikerketaren helburuak

Duela gutxi deskribatu da ATAD3 gene-familian alterazio genetikoak giza gaixotasunen sortzaile direla (Harel et al., 2016), eta, ordutik, geroz eta kasu gehiago deskribatu dira, mutazio eta fenotipo berriekin. ATAD3An nukleotido bakarrean aldatzen diren baina aminoazido ezberdin bat kodetzen duten mutazioak deskribatu dira hipotonia, atrofia optikoa, axoien neuropatia, kardiomiopatia hipertrofikoa eta paraparesia espastiko hereditarioa duten gaixoetan (Harel et al., 2016; Cooper et al., 2017). ATAD3 gene-familian delezio bialelikoak dituzten gaixoek, ordea, hipoplasia pontozerebelar larriago bat izaten dute eta ohikoa izaten da jaio eta lehen egunetan hiltzea (Desai et al., 2017; Peeters-Scholte et al., 2017; Frazier et al., 2017). Harel-Yoon sindrome bezala izendatu diren gaixotasunen oinarri genetikoan, orain arte, gehienbat azken horiek izan dira gehien deskribatu direnak, eta delezio horiek ATAD3A eta ATAD3B sekuentzien arteko zati handi bat galtzea dakarte, eta, ondorioz, ATAD3B-A gene-fusio bat sortzen da (Desai et al., 2017).

Harel-Yoon sindromea diagnostikatzea ez da erraza izaten, diagnosirako material genetikoaren sekuentziazio zehatzak egin behar baitira, eta, kasu askotan, ohiko sekuentziazio tekniketatik haratago joan behar da eta. Gainera, sintoma kliniko batzuk gaixotasun mitokondrial klasikoek ematen dituztenak izaten dira, baina mtDNAn mutazio edo aldaketa ezagunak detektatzen saiatzean, negatibo izaten dira, noski. Hortaz, ATAD3 kasu berriak deskubritzeak interes handia du, bai ikuspegi medikotik, baita biozientzietan ikertzen dugunontzat ere.

Hala, gure helburuak dira ATAD3 kasu berriak identifikatzea, eta sakon aztertzea, ikerketa-maila guztietan, arlo genetikotik hasi, zelula-mailan jarraitu eta ondorio klinikoak ulertzeraino. Gure ikerketa-taldearen kasuan, zehazki, gaixoen azaletik lortutako fibroblastoetan ikertzen ditugu gaixotasunaren nondik norakoak, eta fenotipo zelularrak identifikatzen saiatzen gara, gerora diagnosi eta tratamenduetarako balio dakigukenak. Ikusirik barne mintzeko kolesterola gakoa dela mtDNA-ren antolakuntzan (Desai et al., 2017), gure lan-hipotesia da mtDNA-ren antolakuntzak bere produktuetan, zelulen funtzioan eta gaixo/osasun egoeretan eragina duela,

eta mtDNA-ren antolaketa hori mitokondrietako kolesterol-maila parametro jakin batzuen barnean mantentzearen araberakoa dela, neurri handi batean.

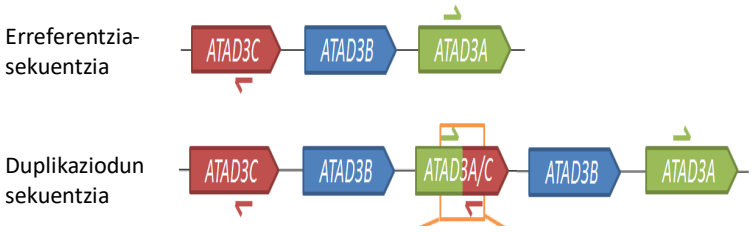
3. Ikerketaren muina

Lan honetan, ATAD3 gene-familian *de novo* duplikazio bat identifikatu dugu, elkarren artean ahaideak ez diren eta beren fenotipo klinikoek sindrome metaboliko bat iradokitzen duten bost indibiduotan. Horietako fenotipo kliniko batzuk bat datoz aurretiaz lokus horretan deskribatutako beste mutazio patogenikoek sortzen dituzten fenotipoekin: kardiomiopatia, hipotonia, substantzia txuriaren aldaketa, akinesia fetala, batzuk aipatzearren. Duplikaziodun gaixo guztiak jaio ondorengo lehen sei asteetan hil ziren, delezioa duten gaixoen antzera (Desai et al., 2017).

ATAD3 gene-familian deskribatu ditugun *de novo* duplikazioak exomen sekuentziazio bidez identifikatu dira. Gerora, duplikazio horien presentzia arrayCGH bidez baieztatu dugu, baita PCR eta Sanger sekuentziazio bidez. Azken proba horietan, 1,2 kilobaseko sekuentzia bat detektatu dugu (duplikazioei dagokiena) gaixoetan, baina ez da inongo sekuentziarik anplifikatu guraso osasuntsuetan. Horrek, beraz, *de novo* gertaera bat detektatu dugula baieztatzen du. Sekuentziazioen emaitzak analizatuz, ikus daiteke duplikazio berri hori ATAD3C-ko 8-12 exoiek, ATAD3B-k eta ATAD3A-ko 1-11 exoiek osatzen dutela, eta hipotesizatu liteke ATAD3C eta ATAD3A geneetako sekuentzia oso homologoen arteko errekonbinazio homologo ez-aleliko bidez (NAHR) gertatu zela.

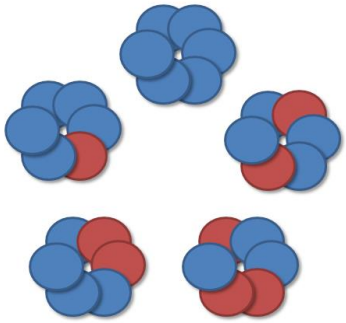
Duplikazioren ondoriozko sekuentziak analizatuta, ikus daiteke duplikaziodun gaixoetan mantentzen dela ATAD3A eta ATAD3C-ren kopia kopurua, ATAD3B duplikatzen dela eta ATAD3A-C gene-fusio bat sortzen dela (1. irudia)(ATAD3A 1-405 aminoazidoetatik ATAD3C 231-411 aminoazidoetara doan proteina sortzen duena). ATAD3A eta ATAD3A-C peptido-sekuenziak *in silico* konparatuz gero, ikus daiteke luzera berekoak direla eta 29 aminoazidotan soilik bereizten direla. Horietatik zazpi, sekuentziaren ATPasa domeinuari dagokion zatian daude eta gainontzeko 22ak domeinu funtzional ezagun batetik kanpo daude.

1. irudia. Duplikazioak sortutako sekuentziaren eskema ATAD3 lokusean. Erreferentzia-sekuentzia (goian) ATAD3 lokusak duen ohiko antolaketarekin, eta duplikazioa pairatu duen gaixo baten sekuentziaren eskema (behean), non ATAD3B-ren bi kopia ikus daitezkeen eta ATAD3A-C gene-fusioa (lauki horian).



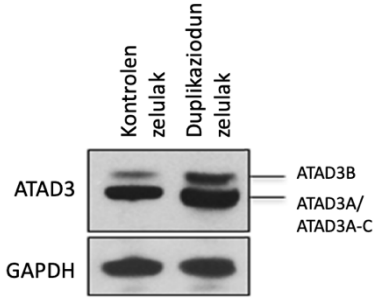
ATAD3 proteinak itzultzen direnean hexameroak osatzen dituzte euren artean batuz, eta 6 ATAD3 proteinaz osatutako egitura multimeriko hori da funtzionala dena eta mitokondrian kokatzen dena (Baudier et al., 2018). Sekuentziek ere ematen digute hexameroen egituraren predikzioa eta honakoa litzateke: ATAD3A-ren bi kopia eta ATAD3A-C fusioaren kopia bakarra egonez gero, hexameroen %8,8-a ATAD3A monomeroz bakarrik osatuta legoke eta gainontzeko %92,1-ak gutxienez ATAD3A-C monomero bat luke bere egituran (2. irudia). Sekuentziek adierazten digute, baita ere, gene-fusioa ziurrenik behar bezala transkribatu eta itzultzen dela, eta berezko kokapen subzelularrerako beharrezko seinale-sekuentziak mantentzen dituela.

2. irudia. ATAD3 proteinek hexameroak osatzen dituzte eta gutxienez ATAD3A-C monomero baten (gorriz) txertaketa hexameroan %92,1 kasutan gertatzen da.



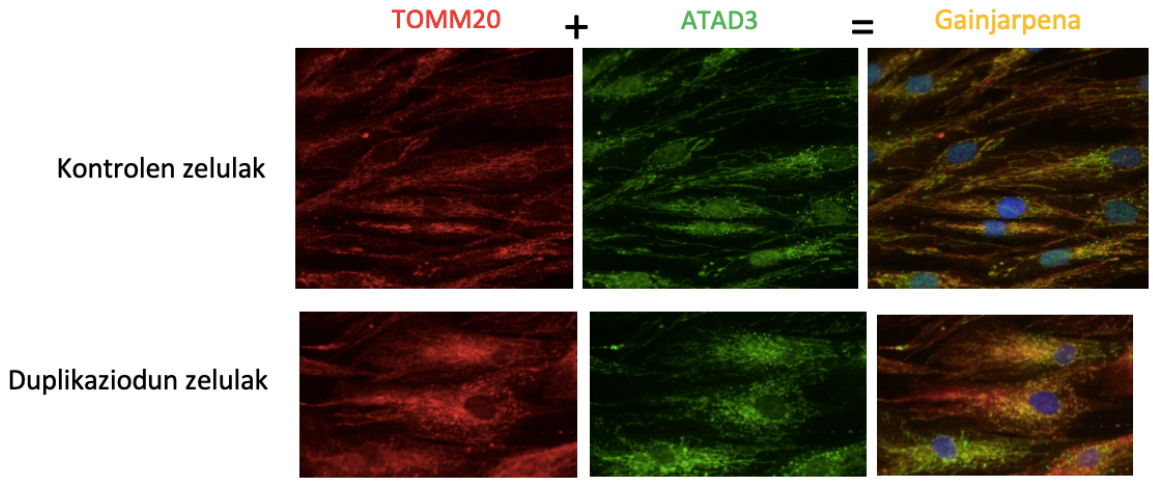
Laborategian egiaztatzen badugu exomen sekuentziei buruzko informazioa gaixoetatik eratorritako fibroblasto zeluletan, euren proteinak kuantifikatuz Western Blot analisiak (WB) erakusten digu duplikazioa pairatu duten fibroblastoek ATAD3 proteina kontrol osasuntsuek baino gehiago adierazten dutela (3. irudia). Goiko banda ATAD3B-ri dagokio, eta beraz, banda horren seinalea handiagoa izatea ATAD3B-ren beste kopia bat izateak azalduko luke. ATAD3A ez denez guztiz duplikatzen, WB-aren beheko bandaren seinalea areagotzeak esaten digu ATAD3A-C proteina fusionatua adierazi egiten dela eta egonkorra dela.

3. irudia. Anti-ATAD3-ren aurkako antigorputzak erabiliz lortutako WBa. Duplikaziodun zeluletan ATAD3B-ren banda intentsoagoa da, ATAD3B duplikatu denaren seinale, eta ATAD3A eta ATAD3A-C proteinek tamaina bera dutenez, bien banda nabarmen da intentsoagoa, proteina-fusioa adierazten delaren seinale. GAPDH proteina WBean kargatutako proteinaren indikatzaile da.



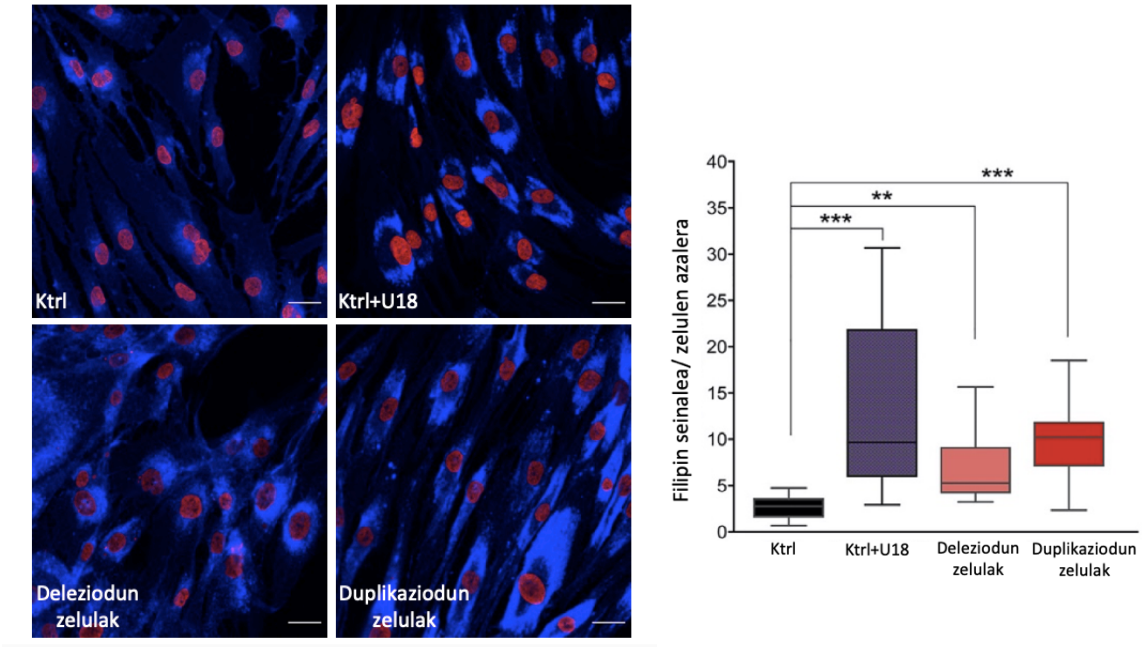
Badakigu ATAD3 proteina mitokondriala dela (Gilquin et al., 2010), eta antigorputz-bidezko ATAD3 proteinaren markaketak erakusten digu gaixoen fibroblastoetan kontroletan dutenaren antzeko banaketa duela, baita mitokondrien kanpo-mintzeko TOMM20 proteinarekikoa ere (4. irudia). Hortaz, badirudi bai ATAD3B duplikazioak eta ATAD3A-C gene fusionatuaren proteina-produktuak mitokondrian kokatuta ageri direla.

4. irudia. Zelulak ATAD3-rekiko (berdez) eta mitokondrietako TOMM20-rekiko antigorputzekin (gorriz) markatuz, ikus daiteke kontroletan bezalaxe (goiko irudiak), gaixoen zeluletan ere (beheko irudiak) ATAD3 adierazi egiten dela eta TOMM20-rekin kolokalizatzen duela (eskubiko irudiak, aurreko bi irudiak gainjarrita).



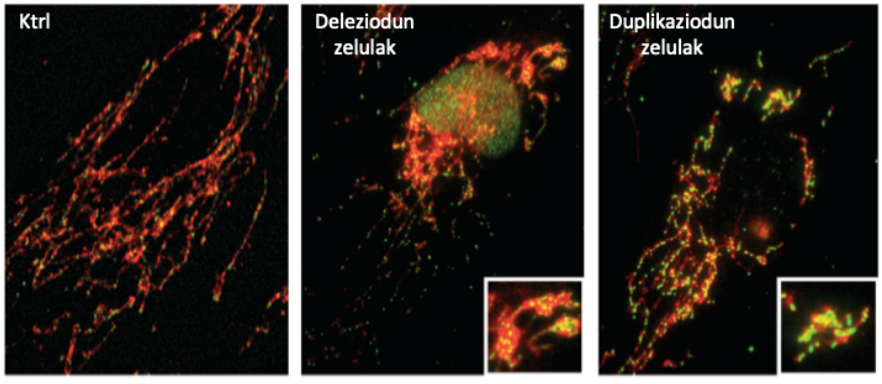
Arestian aipatu bezala, mitokondrien morfologian eta kolesterol-mailan aldaketak deskribatu dira ATAD3n delezioak dituzten gaixoetatik eskuratutako fibroblastoetan (Desai et al., 2017). Hortaz, deleziodun gaixoetan ikusitako fenotipo zelularrak duplikazioak dituztenen fibroblastoetan ere agertzen diren begiratzea litzateke hurrengo urratsa. Filipin tindatzaile fluoreszentearen bidez markatutako kolesterol librea edo esterifikatu gabea nabarmen handiagoa da fibroblasto kontrolek dutenarekin alderatuz, eta ATAD3 deleziodun gaixoen zelulenen antzekoa. U18666A izeneko zelula-barneko kolesterolaren mugimendua eragozten duen molekula erabiliz, ikus dezakegu zelula kontroletan antzeko kolesterol librearen mailak lor daitezkeela, eta, beraz, ondoriozta dezakegu deleziodun gaixoetan ere kolesterol librearen metabolismoan akatsen bat dagoela (5. irudia).

5. irudia. Fibroblasto kontroletan (Ktrl), U18666A-z trataturiko kontroletan (Ktrl+U18) eta deleziodun nahiz duplikaziodun zeluletan kolesterol esterifikatu gabea markatzen duen Filipin konposatua erabiliz lortutako irudiak eta dagokien kuantifikazioa.



Antigorputzen bidezko markaketa fluoreszenteak eginez, mtDNA eta mitokondrietako TOMM20 proteina markatu ditzakegu, eta ikus dezakegu zelula kontrolen ohiko sare-morfologia galdu egiten dela duplikazioa duten gaixoen zeluletan (4. irudia eta 6. irudia) eta mtDNAren pilaketak ere agertzen direla, askotan deleziodun gaixoetan ikus daitezkeenak baino handiagoak (6. irudia).

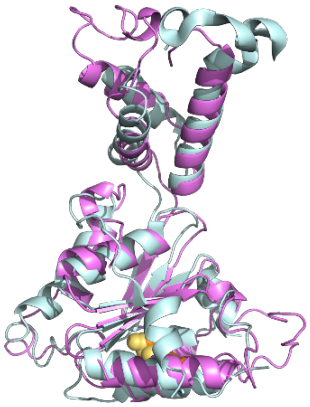
6. irudia. TOMM20 (gorriz) eta DNA (berdez) markatutako zeluletan, deleziodun eta duplikaziodun fibroblastoetan mitokondriaren ohiko sare-morfologia galtzen da, eta mtDNAren pilaketak ikus daitezke, bereziki duplikaziodun zeluletan.



Ezaugarri horiek guztiak ATAD3 deleziodunek dituzten antzekoak direnez (Desai et al., 2017), nahiz eta ATAD3A-C proteina-fusioak zelulan kokapen egokia hartzen duen eta behar bezala adierazten den, ondoriozta dezakegu ez duela bere funtzioa behar bezala betetzen, eta, hartara, mitokondrien ohiko sare-morfologia kaltetzen duela, baita mtDNA-ren antolaketa ere, eta zelulako kolesterolaren metabolismoan ondorio negatiboak sortzen dituela.

ATAD3A-C ATAD3A proteinarengandik C-terminaleko 29 aminoazidotan bereizten da, eta horien artean dago ebolutiboki oso kontserbatua dagoen aminoazido bat (p.Arg466Cys) ATPasa domeinuan kokatua (7. irudia). Aminoazido hori ATPasa duten domeinu guztietan dago eta arginina-behatz bat bezala funtzionatzen du, alegia, inguruko monomeroen ATP-aren g-fosfatoari lotzen zaion aminoazido bat da (Ogura et al., 2004). Hala, SPAST proteinak duen arginina-behatz baliokidean deskribaturiko hainbat mutaziok SPAST proteinaren ATPasa aktibitatea guztiz galtzea eragiten dute eta paraparesia espastiko hereditarioa sortzen dute (SPG4)(Evans et al., 2005). SPAST eta ATAD3 proteinak gainjarrita egitura ia identikoa dutela ikus daiteke (7.irudia). Beraz, gure ustez, artikulu honetan deskribatutako ATAD3 duplikazioek SPAST-en era berean funtzionatu lezakete fusio-proteinak sortzen dituen monomero ez-funtzionalak hexameroen %90ean baino gehiagotan pilatzen direnean.

7. irudia. SPAST (grisa) eta ATAD3A (morea) proteinen ATPasa domeinuaren egituraren errepresentazioa bata bestearekiko gainjarrita. Horiz arginina-behatza.



Aipatu beharra dago, deleziodun gaixoetariko batek ere ez zuela mitokondrietan aparteko akats edo kalterik iradoki zezakeen sintomarik erakusten, baina demostratu dugu, jada, zein inplikatuta dagoen mitokondria gaixo hauetan, bai gaixotasuna bera sortzen duen proteina akastuna (ATAD3) mitokondrioetan dagoelako eta baita gaixoen fibroblastoetan deskribatu ditugun mitokondrioetako alterazioengatik ere. Horrek erakusten digu, ATAD3 bezalako kasu arraroetan mitokondrietan dauden proteinak kontuan hartzeak duen garrantzia, proteina horiek nukleoan kodetuak izan arren.

4. Ondorioak

Artikulu honetan deskribatutako ATAD3 duplikazioa duten gaixoek zabaldu egiten dute ATAD3-rekin erlazionatutako gaixotasunen espektro genetikoa. Artikulu honetako gaixoetan ATAD3 duplikazioak hain maiztasun altuetan deskribatu direnez, gure ustez kontuan izan beharko litzateke ATAD3 lokusa, eta arretaz aztertu, ba ote den nukleotido bakarreko mutaziorik edo kopia kopuruaren aldaketarik jaioberrietan jatorri ezezaguneko gaixotasun larriren baten susmoa dagoenean, eta mutazio mitokondrial ezagunetarako eta panel genomiko nuklearretarako negatibo direnean.

Gure datuek erakusten dute proteina-fusioak gaixotasun neurologiko larri hori sortzen duela kolesterolaren eta mitokondrien metabolismoan eraginez (5. eta 6. irudiak). Horrek ATAD3-ren, kolesterolaren eta mtDNA-ren arteko lotura estutzen du. Kontuan badugu mitokondrien mintzetako kolesterolaren gehiengoak mtDNA-rekin kopurifikatzen duela, eta kolesterolaren eskuragarritasuna handitzeak edo txikitzeak nabarmen aldatzen duela mtDNA-ren antolaketa (Desai et al., 2017), argi dago, kolesterolaren homeostasia era hertsian kontrolatzea ezinbestekoa dela mtDNA-ren metabolismoa era egokian mantentzeko. Gainera, badakigu ATAD3 proteina kolesterolaren metabolismoarekin erlazionatu daitekeela TSPO, CYP11A1 eta

SPTLC bere proteina-kideen bitartez (Rone et al., 2012). Beraz, kolesterol-alterazioak dituzten mintzeko mikrodomeinu fisikoak izan litezke ATAD3 mutazio patologikoen faktore komuna.

5. Etorkizunerako planteatzen den norabidea

Gure datuen arabera, ATAD3-n birkonbinazio genetikoek zerebeloaren garapena endekatzen dute jaioberrietan, kolesterolaren metabolismoan eta mitokondrian gertatzen diren hainbat akats direla eta. Antzeko akatsak ikusi izan direnez zenbait gaixotasun mitokondrial nahiz neurologikotan (Di Mauro eta Schon, 2008; Cooper et al., 2017), uste dugu ATAD3 gaixoen ezagutzan sakontzeak lagun lezakeela giza gaixotasun askoren tratamenduaren garapenean. Hori dela eta, Harel-Yoon sindromea hobeto ulertzen saiatzeaz gainera, eta gaixotasunaren pronostikoa hobetzeko egin ditzakegun ekarpenez gainera, gure ikerketan gaixoen zelulak modelo gisa erabiltzeak mtDNAren eta kolesterolaren ardatza hobeto ulertzen lagun diezaguke, eta ATAD3 proteinak ardatz horretan duen partehartzea erakutsi. Horrez gainera, mitokondrietako kolesterolaren metabolismoak giza osasunean duen paper garrantzitsua ulertzen lagun diezaguke, eta uste dugu kolesterolaren mailak modulatzen dituzten ohiko farmako asko baliagarriak izan litezkela hainbat gaixotasun neurologikoren sintomak tratatzeko.

Ondorioztatzen dugu ATAD3 proteinak baldintzatzen duela zelularen gaitasuna kolesterola mitokondriaren barne mintzaren beharrezko guneetara eramateko. Gune horietan mtDNA dago, baina, baita ere espero dugu erretikulu endoplasmatikoarekin kontaktu-guneak agertzea (MAM, mitokondriekin asoziaturiko mintzak), mtDNA bikoizten eta kopiak banatzen diren toki horietan erretikulu endoplasmatikoa egon ohi dela deskribatu delako (Lewis et al., 2016). Modelo horrek, beraz, erretikulu endoplasmatikoak kontakizun honetan betetzen duen papera ikertzeko ateak zabaltzen dizkigu.

6. Erreferentziak

Baudier, J. (2018), ATAD3 proteins: brokers of a mitochondria-endoplasmic reticulum connection in mammalian cells. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc*. 93, 827–844.

Becker, W.M., Kleinsmith, L.J., Hardin, J. (2006): *El mundo de la célula.* Pearson Education.

Cooper, H.M., Yang, Y., Ylikallio, E., Khairullin, R., Woldegebriel, R., Lin, K., Euro, L., Palin, E., Wolf, A., Trokovic, R., et al. (2017), ATPase deficient mitochondrial inner membrane protein ATAD3A disturbs mitochondrial dynamics in dominant hereditary spastic paraplegia. *Hum. Mol. Genet*. 26, 1432–1443.

Desai, R., Frazier, A.E., Durigon, R., Patel, H., Jones, A.W., Dalla Rosa, I., Lake, N.J., Compton, A.G., Mountford, H.S., Tucker, E.J., et al. (2017), ATAD3 gene cluster deletions cause cerebellar dysfunction associated with altered mitochondrial DNA and cholesterol metabolism. *Brain*. 140, 1595–1610.

Di Mauro, S. eta Schon, E. (2008), Mitochondrial disorders in the nervous system. *Annu Rev Neurosci*. 31, 91-123.

Evans, K.J., Gomes, E.R., Reisenweber, S.M., Gundersen, G.G., and Lauring, B.P. (2005), Linking axonal degeneration to microtubule remodeling by Spastin-mediated microtubule severing. *J. Cell Biol*. 168, 599–606.

Frazier, A.E., Holt, I.J., Spinazzola, A. eta Thorburn, D.R. (2017), Reply: Genotype-phenotype correlation in ATAD3A deletions: not just of scientific relevance. *Brain*. 140, e67.

Harel, T., Yoon, W.H., Garone, C., Gu, S., Coban-Akdemir, Z., Eldomery, M.K., Posey, J.E., Jhangiani, S.N., Rosenfeld, J.A., Cho, M.T., et al.; Baylor-Hopkins Center for Mendelian Genomics; and University of Washington Center for Mendelian Genomics (2016), Recurrent de novo and biallelic variation of ATAD3A, encoding a mitochondrial membrane protein, results in distinct neurological syndromes. *Am. J. Hum. Genet.* 99, 831–845.

Issop, L., Fan, J., Lee, S., Rone, M.B., Basu, K., Mui, J. eta Papadopoulos, V. (2015), Mitochondria associated membrane formation in hormone stimulated Leydig cell steroidogenesis: role of ATAD3. *Endocrinology*. 156, 334–345.

Gilquin, B., Taillebourg, E., Cherradi, N., Hubstenberger, A., Gay, O., Merle, N., Assard, N., Fauvarque, M.O., Tomohiro, S., Kuge, O. eta Baudier, J. (2010), The AAAþ ATPase ATAD3A controls mitochondrial dynamics at the interface of the inner and outer membranes. *Mol. Cell. Biol*. 30, 1984–1996.

Gorman, G., Chinnery, P., Di Mauro, S., Hirano, M., Koga, Y., McFarland, R., Suomalainen, A., Thorburn, D., Zeviani, M. eta Turnbull, D. (2016), Mitochondrial diseases. *Nat Rev Dis Primers 2*: 16080.

Gunning, A. C., Strucinska, K., Muñoz-Oreja, M., Parrish, A., Caswell, R., Stals, K. L., Durigon, R., Durlacher-Betzer, K., Cunningham, H., Grochowski, C., Baptista, J., Tysoe, C., Baple, E., Lahiri, N., et al. (2020), Recurrent de novo NAHR reciprocal duplications in the ATAD3 gene cluster cause a neurogenetic trait with perturbed cholesterol and mitochondrial metabolism. *The American Journal of Human Genetics*, *106*(2), 272-279.

Lewis, S., Uchiyama, L. eta Nunnari, J. (2016), ER-mitochondria contacts couple mtDNA synthesis with mitochondrial division in human cells. *Science*. 353, 6296, aaf5549.

Ogura, T., Whiteheart, S.W., eta Wilkinson, A.J. (2004), Conserved arginine residues implicated in ATP hydrolysis, nucleotide-sensing, and intersubunit interactions in AAA and AAAþ ATPases. *J. Struct*. Biol. 146, 106–112.

Peeters-Scholte, C.M.P.C.D., Adama van Scheltema, P.N., Klumper, F.J.C.M., Everwijn, S.M.P., Koopmans, M., Hoffer, M.J.V., Koopmann, T.T., Ruivenkamp, C.A.L., Steggerda, S.J., van der Knaap, M.S. eta Santen, G.W.E. (2017), Genotype-phenotype correlation in ATAD3A deletions: not just of scientific relevance. *Brain*. 140, e66.

Peralta, S., Goffart, S., Williams, S.L., Diaz, F., Garcia, S., Nissanka, N., Area-Gomez, E., Pohjoisma ̈ki, J. eta Moraes, C.T. (2018), ATAD3 controls mitochondrial cristae structure in mouse muscle, influencing mtDNA replication and cholesterol levels. *J. Cell Sci.* 131, jcs217075.

Rone, M.B., Midzak, A.S., Issop, L., Rammouz, G., Jagannathan, S., Fan, J., Ye, X., Blonder, J., Veenstra, T. eta Papadopoulos, V. (2012), Identification of a dynamic mitochondrial protein complex driving cholesterol import, trafficking, and metabolism to steroid hormones. *Mol. Endocrinol*. 26, 1868–1882.

Sastre, J., Pamplona, R., Ramón, J.R. (2009): *Biogerontología médica*. Ergon.

7. Eskerrak eta oharrak

Lan hau 2020an American Journal of Human Genetics aldizkarian Gunning et al., 2019 bezala argitaratua dagoenaren moldaketa bat da, era ulerterrazago eta sinplifikatuan idatzia, eta, nola ez, euskaraz. Gainera, mezua hobeto ulertzeko edukiak eta irudiak aldatu dira, eta lehen autoreak propio egindakoak gailendu dira.

Mila esker lan hau aurrera atera dadin lagundu duten guztiei. Bereziki, eskerrak nire tesi zuzendariei (Ian eta Itxaso), taldeko kideei (Uxoa batez ere), eta, nola ez, gaixotasun bortitz hau duten gaixoei eta beren familiei.

Manganeso dioxidozko superkondentsadore hibridoen karakterizazio elektrokimikoa

Rodriguez-Romero, J., Goikolea Nuñez, E. eta Ruiz de Larramendi Villanueva, I.
Kimika Organiko eta Ez-Organikoko saila, Zientzia eta Teknologia Fakultatea, Euskal Herriko Unibertsitatea UPV/EHU
jon.rodriguez@ehu.eus

Laburpena

Ikerketa lan honetan superkondentsadore hibrido bat prestatu da, elektrodo positibo gisa manganeso dioxidoa erabiliz eta elektrodo negatibo moduan ikatz aktibatu komertzial bat. Horretarako hainbat egituratako manganeso dioxido lagin bi prestatu dira eta beraien karakterizazio fisiko-kimikoa eta elektrokimikoa burutu da hiru elektrolito akuoso desberdinetan: 1 M KOH, 0,5 M Na_2SO_4 eta 0,5 M Na_2SO_4 + 0,2 mM $MnSO_4$. Ondoren, emaitza elektrokimiko onenak eman dituen laginarekin sistema hibrido finala eraiki da ikatz:MnO_2 masa-balantze aproposa erabiliz 1 M KOH, eta 0,5 M Na_2SO_4 + 0,2 mM $MnSO_4$ elektrolitoetan. Azken honetan lortu dira emaitzarik onenak, 15,6 Wh kg^{-1}-eko energia dentsitatea lortuz 1 kW kg^{-1}-eko potentzian.

Hitz gakoak: Superkodentsadore hibridoa, energia metaketa, elektrokimika, elektrodo pseudokapazitiboa, manganeso dioxidoa.

Abstract

In this research work, a hybrid supercapacitor has been prepared, using manganese dioxide as positive electrode and commercial activated carbon as negative electrode. Two manganese dioxide samples of different structure have been prepared and their physical-chemical and electrochemical characterization has been carried out in three different aqueous electrolytes: Then, the final hybrid system has been built with the sample that gave the best electrochemical results, using the most appropriate mass balance of AC:MnO_2 and using the electrolytes 1 M KOH and 0,5 M Na_2SO_4 + 0.2 mM $MnSO_4$. The best results were obtained in the latter, with an energy density of 15.6 Wh kg^{-1} at a power of 1 kW kg^{-1}.

Keywords: Hybrid supercapacitor, energy storage systems, electrochemistry, pseudocapacitive electrode, manganese dioxide.

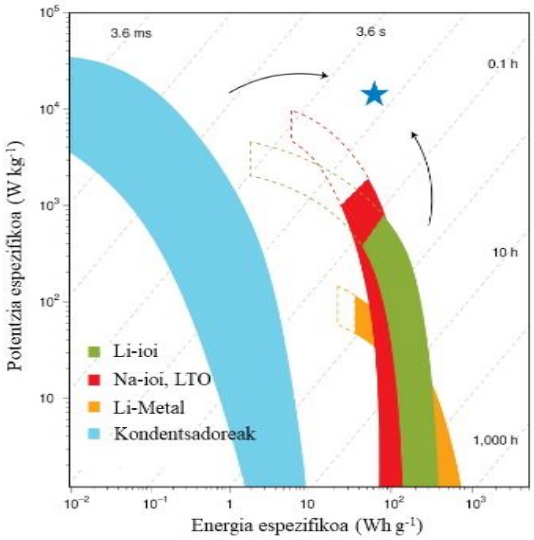
1. Sarrera eta motibazioa (Formatu orokorra eta bibliografia)

Klima aldaketak, egungo eredu energetikoak, erregai fosilen eskasiak eta gainpopulazioak gizartea energia iturri berriztagarri eta iraunkorren bilaketara bultzatzen dute. Honen ondorioz, azken hamarkadetan bulkada handia eman zaie energia eoliko, hidrauliko, eguzki-energia eta beste energia ekoizpen modu alternatiboei. Baina energia iturri hauetako asko aldizkakoak eta ausazkoak dira, hau da, klima, eguraldi edota egun/gauaren menpe daudenez eta gehienetan energia-eskaera handiena duten orduak eta produkzio-orduak bat ez datozenez, energia biltegiratzeko sistemak beharrezkoak dira. Helburu hau betetzeko diseinatutako sistemen artean, bateriak eta superkondentsadoreak (ingelesez *supercapacitor*, SC) azpimarra daitezke. Baterien aldetik, Li-ioizkoak dira erabilienak, 1990. urtean Sonyk aurkeztu zituenetik, izan ere eraginkorrenak dira, 180 Wh.kg^{-1}-ko energia dentsitateak lortu baitzateke. (Tarascon eta Armand, 2001**)**. Superkondentsadoreek, bestalde, ezin dute bateriek beste energia biltegiratu, baina potentzia askoz handiagoarekin deskargatu eta kargatu daitezke, beraz, segundo gutxi batzuetan bateria batek baino energia dentsitate handiagoa askatzeko gai dira. Beraz haien energia espezifikoa 10 aldiz txikiagoa da baina potentzia espezifikoak 100 aldiz handiagoak izan daitezke (Conway, 1999). Energia biltegiratzeko zenbait sistemen energia eta potentziaren arteko erlazioa 1. Irudian erakusten den *Ragone plot*-ean ikus daiteke (Simon eta Gogotsi, 2020)

Hala ere, energia eta potentziaz gain, beste hainbat ezaugarri erabakigarriak izango dira aplikazio jakin baterako sistema bat ala bestea aukeratzeko orduan. Aldagai horiek prezioa, tenperatura tarte eraginkorra, ziklabilitatea, segurtasuna eta ingurugiroarekiko adeitasuna dira besteak beste. SCek, nahiz eta hasiera batean garestiagoak diruditen, beren ziklabilitate

handiagatik, kostu oso baxua dute karga/deskarga zikloko bateriekin alderatuz. Izan ere bateria gehienek milaka ziklo batzuetako bizitza erabilgarria aurkezten dute SCek milioika eskaintzen duten bitartean. Azpimarratzekoa da ere, ikerkuntza eta merkatu mailan SCek duten karga metatzeko ahalmena kapazitantziaren bitartez (faradetan, F, neurtua) neurtzen dela, baterietan kapazitateaz (miliampere orduko, mA h) hitz egiten den bitartean.

1. Irudia: Energia biltegiratzeko gailuen errendimendua azaltzen duen grafikoa: Ragone Plot. (Simon eta Gogotsi, 2020)



Hala eta guztiz ere, bateriak eta SCak ez dira sistema lehiakideak bezala ikusi behar, izan ere, bi teknologia hauek osagarriak izaten dira sarritan. Are gehiago, hainbat erabilerarako, potentzia eta energia dentsitate handien pean lan egin dezaketen sistemak garatzeko premia sortu da azken urteotan, "superkondentsadore hibridoak" hain zuzen ere. Hau da, sistema berri hauek 1. Irudian izar baten bidez adierazitako energia-potentzia eremua betetzea dute helburu.

2. Arloko egoera eta ikerketaren helburuak

Aipatutako bi sistemak –SCak eta bateriak– funtsezko 3 ataletan banatu daitezke, elektrodo negatiboa, elektrodo positiboa eta elektrolitoa, baina bi sistemen elektrokimika mekanismo desberdinetan oinarritzen da. SC motako elektrodoak kargak biltegiratzen ditu haren gainazaleko poroetan elektrolitoko ioiak adsorbatu eta desorbatuz (mekanismo kapazitiboa), horregatik, erabilienetariko elektrodorako materialen artean, ikatz mikroporotsuz osatutako elektrodoak aurkitu daitezke; beraien prezio baxu, eskuragarritasun eta azalera espezifiko balio altuengatik (> 1000 m^2 g^{-1}) (ingelesez *specific surface area*, SSA) (Shi, 1996).

SC hibridoak garatzeko, normalean elektrodo kapazitibo bat eta beste mota bateko elektrodo bat sistema berdinean konbinatzen dira, haien propietateen sinergia bilatzeko asmoz. Orokorrean, bigarren elektrodo horiek bateria motako elektrodoak izaten dira, haren elektrokimika elektrodoaren osotasunean gertatzen diren erredox erreakzioetan oinarritzen dutenak (prozesu faradaikoetan). Hala ere, badaude beste mota bateko SC elektrodoak, mekanismo kapazitiboen bitartez funtzionatzen ez dutenak, eta sistema hibridoak prestatzeko SC elektrodo arruntekin batera erabiltzen direnak. Elektrodo mota hauek "pseudokapazitibo" bezala ezagutzen dira, eta soilik gainazalean gertatzen diren erredox erreakzio azkar eta itzulgarriak erabiltzen dituzte energia biltegiratzeko (Lu *et al.*, 2013). Elektrodo hauek ez dute bateria motakoek duten zinetika motelaren arazoa, elektrodo faradaikoek sistema hibrido osoa mugatu ohi baitute elektrodo kapazitiboaren adsortzio/desortzio prozesuen zinetika askoz azkarragoa delako. Gainera, elektrodo pseudokapazitiboek elektrolito urtsuak erabiltzeko aukera ematen dute, elektrolito organikoak baino potentzial leiho estuagoa (~3 V vs ~1 V) dutenak, baina askoz ere seguroagoak, eta merkeagoak direnak, eta ingurumenerako askoz ere jasangarriagoak direnak (Yang *et al.*, 2007). Elektrolito urtsuen lan potentzial murriztuak, 1. Ekuazioan adierazten den bezala, sistemak

biltegiratu dezakeen energia dentsitatea murrizten du, bi parametroak proportzionalak baitira. Baina elektrodo pseudokapazitiboen erabileraren gakoa euren mekanismoak bi kapazitantzia (*C*) magnitude orden gehiagoko balioetan lan egitea ahalbidetzen duela da, potentzial leiho (*V*) murriztuaren eragin negatiboaren kontra eginez (Béguin eta Frąckowiak, 2013).

$$E_{SC} = \frac{1}{2} C\, V^2 \qquad (1)$$

Elektrodo pseudokapazitiboak ekoizteko material erabilienak trantsizio metal oxidoak (adibidez RuO_2, MnO_2, CoO_x, NiO, Fe_2O_3, etab.) edo polimero eroaleak (polipirrola, polianilina edo poli(3,4-etilenedioxitiofenoa) besteak beste) izan ohi dira. Lan honetan, elektrodo positiborako material pseudokapazitibo bezala, RuO_2 proposatu izan da, oso kapazitantzia balio altuak lortu izan dituelako (Wang *et al.*, 2012), baina bere kutsagarritasun eta prezio altuak direla eta; askoz eskuragarriagoa, merkeagoa eta fidagarriagoa den manganeso oxidoarekin saiatzera bultzatu gaitu. MnO_2-arekin 1100-1300 F g^{-1}-ko kapazitantzia balio teorikoak lor daitezke 10-100 nm-ko elektrodoekin, nahiz eta lodiera arrunteko (~ 100 µm) elektrodoekin 125-250 F g^{-1}-ko balioak lortzen diren (Toupin *et al.*, 2002) Gainera erraz sintetiza daitezke hainbat egitura kristalino eta morfologiatan, SSA altuko nanoegiturekin (20-150 m^2 g^{-1}) (Bélanguer *et al.*, 2008).

3. Ikerketaren muina

Ikerketa honen helburua SC hibrido bat prestatzea da, elektrodo negatibotzat ikatz aktibatu komertzial bat (ingelesez *activated carbons*, AC) eta elektrodo positibotzat taldean sintetizatutako manganeso dioxidozko elektrodo bat erabiliz. Sistema hau eraikitzearen helburu nagusiak SC motako AC//AC superkondentsadore arrunt batek elektrolito berdinean izango lukeen kapazitantzia espezifikoa baino balio altuagoa lortzea eta bibliografian aurki daitezkeen beste MnO_2 lagin batzuekin konparagarriak diren kapazitantzia espezifikoak lortzea dira. Gainera, lan honetan elektrolito urtsuak erabiliko dira, organikoek baino tentsio baxuagoetan lan egitera behartzen dutenak, baina fidagarriagoak direnak erabiltzailearentzat eta ingurumenarekin inpaktu askoz lehunagoa dutenak. Horrela, hiru elektrolito erabili dira (0,5 M Na_2SO_4, 0,5 M Na_2SO_4 + 0,2 mM $MnSO_4$ eta 1 M KOH), euren potentzial leihoa aztertuz, egokiena aukeratzeko.

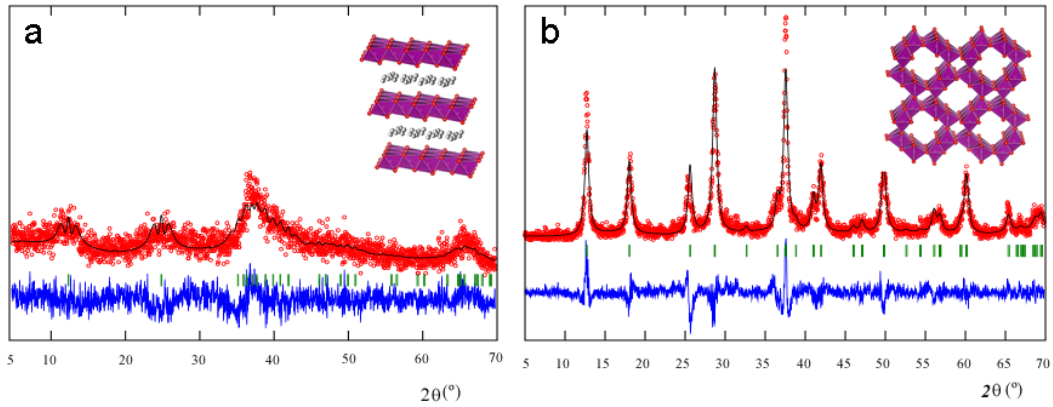
3.1. MnO_2-ren sintesia eta karakterizazio fisiko-kimikoa

Ikerkuntzan lan honetan manganeso dioxido, MnO_2, nanoegituratua prestatzeko jarraitutako bidea Ragupathy *et al*.-ek proposatutakoa izan da (Ragupathy *et al*., 2009). Honetan, oxidatzaile sendoa den potasio permanganatoa, $KMnO_4$ (0,022 mol, PROBUS), erreduzitzailea den etilenglikolarekin (0,009 mol, Panreac) erreakzionarazten da ingurune urtsuan, nano-MnO_2 eta etilenglikolaren produktu oxidatuak, ziurrenik aldehidoak, lortzeko. X-izpien difrakzioa (ingelesez x-ray diffraction, XRD) egin zaio laginari Panalytical X'Pert PRO ekipoa erabiliz 5-70 º (2θ) tartean.

Lortutako difraktograma FullProf Suite programarekin δ-MnO_2-rekin (JCPDS 43-1456) doitu da, talde espaziala *C*2/*m* izanik, eta gelaxka unitateak a=5,174 Å, b=2,850 Å, c=7,336 Å, eta β=103,18 ° (Wang *et al.*, 2012).

Hala ere, 2. Irudian ikusten diren difrakzio maximoen zabalera handiek laginaren kristalinitate maila baxuegia (ia amorfoa) edota partikula tamaina txikiegia dela adierazten dute. Horregatik, kristalinitate maila handitu nahian, laginari hainbat tratamendu termiko egin zaizkio, tenperaturaren igoeraren bitartez difusio atomikoa erraztuz. Zehazki 300, 400, 500 eta 600 ºC-ra tratatu da lagina. Laginik kristalinoena 600 ºC-tara lortutakoa izan da. 2. Irudian ikus daiteke nolakoa izan den laginaren difraktogramaren aldaketa tratamenduaren ondoren. Izan ere, tratamendu termikoaren ondoren, manganeso dioxidoak hutsune tetragonalez osatutako 2x2 tunel itxura duen egitura hartzen du, α-MnO_2 fasea hain zuzen ere (JCPDS 44-0141). Azken fase honen talde espaziala *I*4/*m* da, non a, b = 9,7845 Å eta c = 2,8630 Å diren (Wang *et al.*, 2012). Irakurketa errazte aldera, lan honetan tratamendu termikorik egin zaion laginari *MnO_2* deituko zaio, eta bestetik, 600 ºC-ra tratatutakoari *MnO_2-600*.

2. Irudia: a) tratamendu aurretiko difraktograma, doikuntza, eta 3D irudia. b), 600 ºC-ra tratatu ondorengokoa.



Karakterizazio fisiko-kimikoarekin jarraituz, bi laginen SSA balioak N_2 adsortzio/desortzio neurketen bitartez lortutako datuetatik kalkulatu dira BET (Brunauer–Emmett–Teller) teoria erabiliz. Horretarako, Quantachrome AutosorbIQ ekipoa erabili da, inguru tenperaturan eta 273 K-etan, lortutako SSA balioak 197 $m^2\ g^{-1}$ eta 24 $m^2\ g^{-1}$ izanik MnO_2 eta MnO_2-600 laginetarako hurrenez hurren. Laginen konposizioa zehazteko analisi termograbimetriko diferentziala egin da Ar atmosferan Netzsch STA 449 C ekipo batean, eta lortutako masa galerek, ICP-AES teknikatik eratorriko emaitzekin batera, bi laginen formula zehatzak lortzea ahalbidetu dute. Azken teknika hau Agilent Technologies 5100 instrumentuaren bitartez egin da eta laginak lortzeko sintesia potasio permanganatotik abiatzen denez, bi laginen egituran dagoen potasioaren kantitatea zehazteko oso baliogarria izan da. Kalkulatutako K:Mn erlazio atomikoak 0,27:1 (MnO_2) eta 0,26:1 (MnO_2-600) izan dira. Beraz, bi laginetan potasioa dagoela eta tratamendu termikoak potasio atomoen presentzian eraginik ez duela frogatu izan da, hurrengo formulak lortuz: $K_{0,27}MnO_2{\cdot}0{,}27H_2O$, tratatu gabeko laginean, eta $K_{0,26}MnO_2$, 600 ºC-ra tratatutakoan. Qu *et al.*-ek beren ikerketetan azaltzen duten moduan K:Mn erlazio hau duten δ-MnO_2 laginetan, K^+ ioiak eta ur molekulak xaflen arteko pilareak izango lirateke egitura kristalinoa egonkortzen laguntzeko. Gainera, ikerketa horietan 10000 karga/deskarga ziklo baino lehen eta ondoren egindako XRD difraktogramen parekotasunetik, ziklatzean egitura kristalinoan ia aldaketarik gertatzen ez dela ondorioztatzen da (Qu *et al.*, 2010).

3.2. Elektrodo eta elektrolitoen ekoizpena

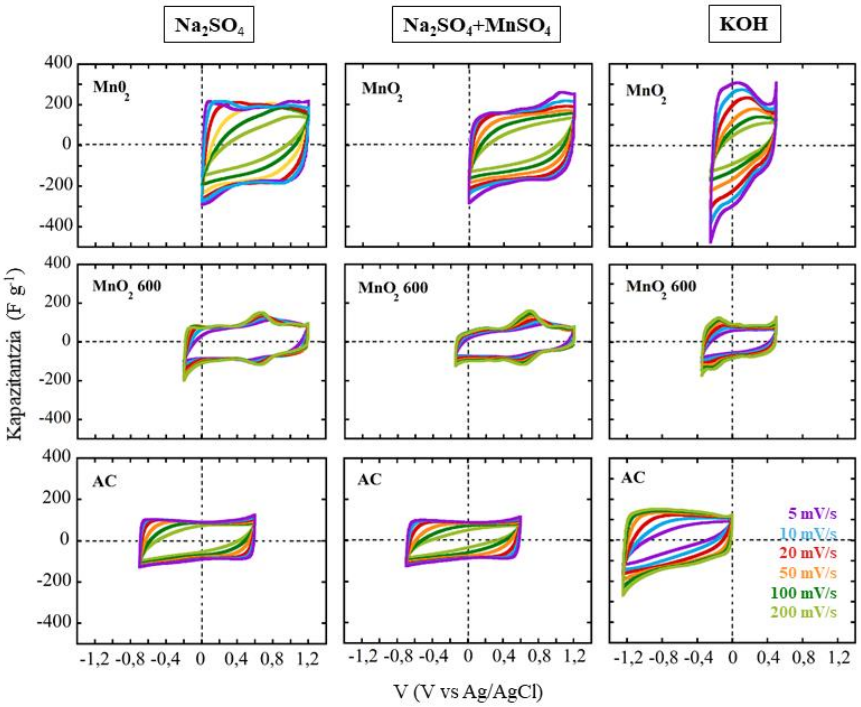
Ikerkuntza honetan erabilitako elektrodo positiboen material aktiboak MnO_2 edo MnO_2-600 izan dira, eta negatiboena, aldiz, NORIT DLC Super 30 AC komertziala (SSA 1600 $m^2\ g^{-1}$). Elektrodo positiboetan erabili den konposizio zehatza hau izan da: % 70 material aktiboa, % 20 SUPER C65 (Timcal) ikatz eroalea – eroankortasuna handitzeko-, eta % 10 politetrafluoroetileno (PTFE) aglomeratzailea (Sigma Aldrich, pisuan % 60 disoluzio urtsua). Elektrodo negatiboetan, aldiz, konposizioa % 95 AC eta % 5 PTFE izan da. Bi elektrodoak ekoizteko prozedura berdina izan da, osagai guztiak homogeneizatu dira etanola erabiliz eta nahasteak lamina forma hartzeko plastikotasuna izan arte (~ 150 µm-ko lodiera). Ondoren lortutako geruza (laminatua) 80 ºC-tan lehortu da 12 orduz eta 11 mm-ko diametroko elektrodo zirkularretan moztu da.

Sistema finalerako elektrolito egokiena zein den aztertzeko hiru elektrolito urtsu prestatu dira: 0,5 M Na_2SO_4 (lan honetan *Na_2SO_4* deituko zaio), 0,5 M Na_2SO_4 + 0,2 mM $MnSO_4$ (*Na_2SO_4+$MnSO_4$*) eta 1 M KOH (*KOH*). Erabilitako hiru erreaktiboak Sigma Aldrich etxe komertzialekoak izan dira. Aipatutako bigarren elektrolitoa, *Na_2SO_4+$MnSO_4$*, Mn^{2+} kontzentrazio baxuak MnO_2 motako elektrodoen portaera elektrokimikoan izan dezakeen onura frogatzeko helburuz prestatu da. Izan ere, elektrolitoko Mn^{2+} ioien oxidazio elektrokimikoa dela eta elektrodoaren gainean nanogeruza porotsuak jalki eta, ondorioz, ziklabilitatea eta ahalmen kapazitiboa hobe daitekela argitaratu izan da (Liu *et al.*, 2019).

3.3. MnO_2-ren eta ACren karakterizazio elektrokimikoa

Bi elektrodo motak sistema final batean konbinatu baino lehen, beharrezkoa da banakako karakterizazio elektrokimikoa egitea, bakoitzen izaera eta kapazitantzia balioak ezagutzeko eta elektrodoen arteko masa balantze egoki bat proposatu ahal izateko. Beraz, elektrodo bakoitzaren elektrokimika aztertzeko, hiru elektrodotako Swagelok® gelaxkak eraiki dira. Horietan, lan-elektrodo gisa MnO_2, MnO_2-600 edota AC erabili dira, kontra-elektrodo moduan beste AC elektrodo bat, erreferentzia gisa Ag/AgCl (Metrohm, 3 M KCl) elektrodo bat eta elektrolito moduan aurretik aipatutako disoluzioak. Analisi elektrokimikorako voltamperometria ziklikoak burutu dira (ingelesez *cyclic voltammetry*, CV), BioLogic VMP3 potentziostato/galvanostatoan. CVak 5, 10, 20, 50, 100 eta 200 mV/s-ko ekorketa abiaduretan egin dira, elektrolitoa eta materialaren arabera potentzial leiho ezberdin batean.

3. Irudia: Lagin bakoitzak elektrolito bakoitzean eman duen emaitza CVetan.

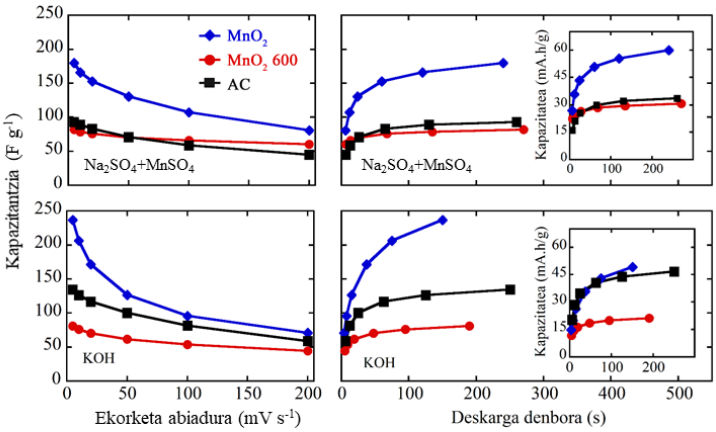


SCen energia dentsitatea, kapazitantziaren eta potentzial leihoaren menpekoa denez, CVetan bi parametro horiek aztertu dira. Orokorrean, ekorketa abiadura igo ahala, korronte intentsitate handiagoak neurtu diren arren erresistentziak gora egiten duenez kapazitantzia txikituz doa. Aipagarria da ere ACarekin lortzen diren CVak ia erabat karratuak direla, perturbazio handirik gabekoak eta portaera kapazitibo puruaren seinale direnak. Oxidoek, aldiz, gorabehera gehiagoko CV irregularragoak ematen dituzte, erredox erreakzioek sortuak (portaera pseudokapazitiboa) (Goikolea eta Mysyk, 2017). Gainera, MnO_2-dun laginetan lortutako potentzial leihoak potentzial balio positiboagoetarantza desplazatuak daude ACarekin konparatuz, espero zen bezala, lagin oxidoak elektrodo positibo gisa erabiltzeko egokiagoak direla baieztatuz.

Bi manganesodun laginak alderatuz, begi bistakoa da MnO_2 laginak bere ahaideak baino kapazitantzia balio askoz altuagoak lortu dituela, nahiz eta MnO_2-600 laginak potentzial leiho apur bat zabalagoa erregistratu duen. Horrek sistema finalerako MnO_2 lagina hobea dela pentsatzera garamatza. Elektrodoek bi sulfatodun elektrolitoetan aurkeztu dituzten kapazitantziak antzekoak dira, hala ere, konparazioa 4. Irudian errazago atzematen da, Na_2SO_4+$MnSO_4$ elektrolitoan kapazitateak apur bat handiagoak izanik. Hortaz, baliteke Mn^{2+} espezien presentzia erantzun elektrokimikoan eragin positiboa izatea. Beraz, sistema finalerako Na_2SO_4 elektrolitoa baztertzea pentsatu da. Sulfatodun elektrolitoez gain, KOH elektrolitoan lortutako emaitzek desberdintasun handiagoak erakutsi dituzte. Oro har, leiho guztiak balio negatiboagoetan agertu dira, eta manganeso dioxidoen kasuan, leiho estuagoak lortu dira (0,8 V *vs* 1,2 V). Hala ere, ikusi

daitekeenez, kapazitantzia balio altuagoak aurkeztu ditu MnO_2-ak sulfatodun elektrolitoekin alderatuz (237 F g^{-1} *vs* 180 F g^{-1}), beraz, ezin daiteke ondorioztatu zein elektrolitok izango duen erantzun elektrokimiko hobea sistema finalean, Na_2SO_4+$MnSO_4$-ak edo KOH-ak.

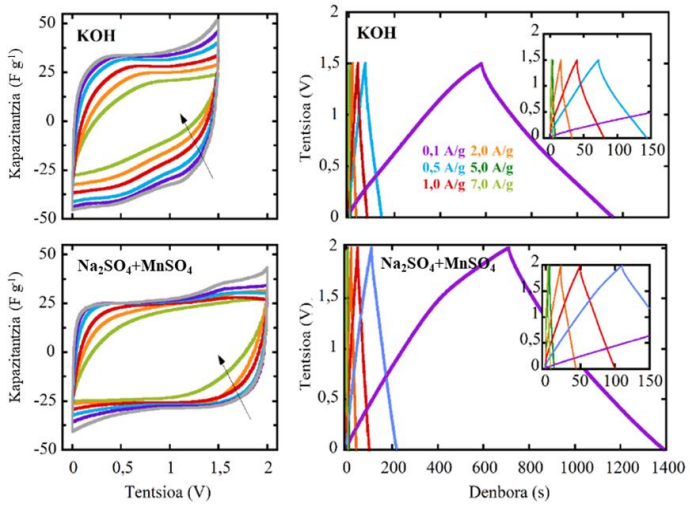
4. Irudia: Irudia: Ezkerraldean, elektrolito bakoitzean 3 laginen kapazitantzia espezifikoak ekorketa abiadurarekiko. Eskuinaldean, kapazitantzia eta kapazitate espezifikoak deskarga denboraren arabera.



3.4. Sistema finalaren karakterizazio elektrokimikoa

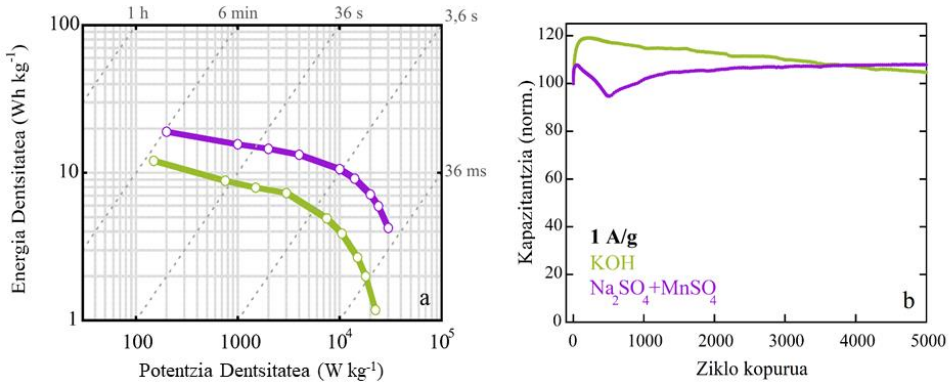
Sistema finalean, aurretik aipatu den moduan, MnO_2 elektrodoa erabiliko da elektrodo positibo modura, eta AC, aldiz, elektrodo negatibo gisa. Bi elektrolito ezberdinetan aztertuko da sistema, KOH eta Na_2SO_4+$MnSO_4$-an. Sistema hibrido hau, bi elektrodoko Swagelok® gelaxka batean eraiki da, erreferentzia elektrodorik gabe, beraz analisi elektrokimikoetan gelaxka osoaren tentsioa (V) neurtuko da. Sistema optimizatzeko banakako elektrodoen kapazitantzia ezagutzea beharrezkoa da, masa balantze baten bidez karga negatibo eta positiboak orekatzeko. Kapazitateak elektrodo masa unitate bakoitzeko, metatu edo askatutako karga adierazten duenez, 4. Irudian ere parametro hau deskarga denborarekiko irudikatu da. Bertan ikus daiteke Na_2SO_4+$MnSO_4$ elektrolitoan, MnO_2 elektrodoak, deskarga denbora oso txikietan izan ezik, orokorrean ACaren kapazitatearen bikoitza aurkezten duela; ondorioz, sistema finalerako onena ACko elektrodoak masa bikoitza izatea litzake, hots, AC:MnO_2 2:1 masa balantzea egitea. KOH elektrolitoan, aldiz, bi elektrodoek pareko kapazitate balioak erakusten dituzte aztertutako deskarga denbora tarte guztian, beraz, 1:1 masa balantzea erabiliko da kasu horretan. Hasteko, elektrolito bakoitzerako sistemaren tentsio eraginkorra zein den aztertu da CVen bitartez. Gainera, 5. Irudian ikusten denez, CVen profil karratua SC batentzako espero genukeena da, ekorketa abiadura handitzearekin apur bat distortsionatzen dena.

5. Irudia: Ezkerrean, KOH eta Na_2SO_4+$MnSO_4$ elektrolitoen neurtutako CVak, 5, 10 , 20, 50, 100 eta 200 mV s^{-1}-tan. Eskuinean, GA karga/deskargen profilak aipatutako elektrolitoetan.



Behin gelaxken tentsioa ezaguna denean, karga/deskarga galvanostatikoak, (ingelesez *galvanostatic charge/discharge*, GA *charge/discharge*) burutu dira gelaxka tentsio horietan, kapazitantzia espezifikoa kalkulatzeko. GA karga/deskargetan erabilitako korronte dentsitateak 0,1, 0,5, 0,7, 1, 2, 5, 7, 10, 12, eta 15 A g^{-1} izan dira. Ikusten denez, karga/deskarga profilak linealak dira erabilitako korronte dentsitate guztietan. Na_2SO_4+$MnSO_4$ elektrolitoan lan egin duten gelaxkek tentsio handiagoak lortu dituzte, 2 V-koak hain zuzen ere. Gelaxken tentsioaz gain, sistemek biltegiratu dezaketen energia dentsitatea jakiteko, kapazitantzia balioak ere aztertu behar dira. GA karga eta deskargek sistema batek karga kantitate zehatz bat biltegiratzeko edota askatzeko zenbat denbora behar duen jakitea ahalbidetzen dute. Beraz, aplikatutako korrontea ezaguna denez, sistemaren kapazitantzia kalkulatzea posiblea da. Na_2SO_4+$MnSO_4$ elektrolitoan lan egin duen gelaxkaren kasuan, lan-tentsioa handiagoa izateaz gain, kapazitantzia espezifiko balio altuagoak ere lortu dira ia aztertutako korronte dentsitate tarte osoan. Elektrolito horretan, energia dentsitatearen erantzule diren bi faktore horiek handiagoak direnez (ikusi 1. Ekuazioa), 6a. Irudian irudikatu den Ragone Plot-ean antzeman daiteke nola balio altuagoak lortu egiten dituen neurtutako potentzia guztietan. Beraz, δ-MnO_2 elektrodo positiboa duen superkondetsadore hibrido baterako, Na_2SO_4+$MnSO_4$, beste bi elektrolitoak baino egokiagoa dela esan daiteke.

6. Irudia: a) Ragone grafikoa. b) Kapazitantzia balioak 1 A g^{-1}-tan, 5.000 zikloz.



Bukatzeko ziklabilitatea aztertu da, ezaugarri honek sistema baten kapazitantziaren aldaketa neurtzen du baldintza berdinetan neurtutako hainbat GA karga/deskarga zikloren ostean. Kasu honetan, 1 A g^{-1}-ko korronte dentsitatea aplikatuz, 5.000 zikloren ostean sistemek bi elektrolitoetan duten kapazitantzia galera aurkezten da 6.b Irudian. Hasierako zikloetan, bi sistemen kapazitantzia handitu egin da, aurre-egokitze zikloak bezala ezagutzen direnak. KOH-an lan egiten duen sistemak, balio maximotik hasita, % 13-ko kapazitantzia galera izan du ia linealki. Na_2SO_4+$MnSO_4$ erabiltzen duen sistemaren kasuan aldiz, gorakada eta beherakada bat ikus daiteke hasierako ~ 1.000 zikloetan, baina horren ostean sistemaren kapazitantzia nahiko egonkor mantentzen da. Beraz, 5.000 ziklo eta gero bi sistemek izan duten kapazitantziaren erretentzioa altua izan da, % 80tik gorakoa, eta ziurrenik elektrolito hauek erabiliz AC/MnO_2 elektrodo bikotearekin aise lortuko lirateke 10.000 karga/deskarga ziklo kapazitantzia galera aipagarririk gabe (Sharma *et al*., 2007)

4. Ondorioak

Ikerketa honetan, arrakastaz eraiki dira laborategi mailako superkondentsadore hibridoak, δ-MnO_2 erabiliz elektrodo positibo moduan eta ikatz aktibatu komertzial bat elektrodo negatibo gisa. $K_{0,27}MnO_2 \cdot 0{,}27\ H_2O$ formula duen δ-MnO_2 nanoegituratua $KMnO_4$ etilenglikoarekin erreduzituz prestatu da. 600 ºC-ra arteko tratamendu termikoaren ondorioz hasierako $K_{0,27}MnO_2 \cdot 0{,}27\ H_2O$ konposatuaren egitura kristalinoa aldatu egin da, δ-MnO_2 fase laminarretik α-MnO_2 2x2 tuneldun fasera. Lagin hauek KOH elektrolitoan kapazitantzia baliorik handienak aurkezten dituzten bitartean 0,5 M Na_2SO_4 + 0,2 mM $MnSO_4$ elektrolitoan potentzial leiho zabalago batean lan egin dezakete. Horrela, AC/MnO_2 sistema final bi eraiki dira, batean 0,1 M KOH erabiliz elektrolito moduan eta bestean 0,5 M Na_2SO_4 + 0,2 mM $MnSO_4$. Azkeneko kasuan, lortu den lan tentsio zabalagoarengatik (2 V *vs* 1,5 V) eta

orohar lortutako kapazitantzia balio altuagoengatik, sistema honentzat 0,5 M Na_2SO_4 + 0,2 mM $MnSO_4$ elektrolitoa egokiagoa dela ondorioztatu da. 5.000 karga/deskarga zikloren ostean, 0,5 M Na_2SO_4 + 0,2 mM $MnSO_4$ elektrolitoan lan egiten duen sistemak ez du kapazitantzia galerarik aurkeztu eta 15,6 Wh kg^{-1}-eko energia dentsitatea lortu da 1 kW kg^{-1}-eko potentzian.

5. Etorkizunerako planteatzen den norabidea

Manganeso dioxidoak daukan ahalmen pseudokapazitiboa, iturri jasangarri batetik datorren biomasatik eratorritako ikatz aktibatu batekin konbinatzeak, garapen iraunkorreko superkondentsadore hibrido baten ikerketa ahalbidetuko luke. Bestalde, beste elektrolito urtsuen eraginkortasuna aztertzea interesgarria izan daiteke, energia biltegiratzeko sistemen noranzkoa beti baliabide jasangarriei begira baitago.

6. Erreferentziak

Béguin, F., Frąckowiak, E. (2013). *Supercapacitors : Materials, Systems, and Applications*; Wiley-VCH, Weinheim, Germany

Bélanguer, D., Brousse, T., Long, J. W. (2008). Manganese Oxides: Battery Materials Make the Leap to Electrochemical Capacitors. *Interface,* 17 (1), 49-52.

Conway, B. E. (1990). *Electrochemical Supercapacitors : Scientific Fundamentals and Technological Applications*, Plenum Press, New York

Goikolea, E., Mysyk, R. (2017): Chapter Four - Nanotechnology in Electrochemical Capacitors in L. Rodriguez-Martinez, *Emerging Nanotechnologies in Rechargeable Energy Storage Systems*, Elsevier, 131-169.

Liu, C., Chen, Y., Dong, Z., Wu, X., Situ, Y., Huang, H. (2019). Tuning Mn^{2+} additive in the aqueous electrolyte for enhanced cycling stability of birnessite electrodes. *Electrochim. Acta*, 298, 678–684.

Qu, Q., Li, L., Tian, S., Guo, W., Wu, Y., Holze, R. (2010). A cheap asymmetric supercapacitor with high energy at high power: activated carbon//$K_{0.27}MnO_2{\cdot}_{0.6}H_2O$. *J. Power Sources*, 195 (9), 2789–2794.

Ragupathy, P., Park, D. H., Campet, G., Vasan, H. N., Hwang, S.-J., Choy, J.-H., Munichandraiah, N. (2009). Remarkable Capacity Retention of Nanostructured Manganese Oxide upon Cycling as an Electrode Material for Supercapacitor *J. Phys. Chem. C*, 113 (15), 6303–6309.

Sharma, R. K., Oh, H.-S., Shul, Y.-G., Kim, H. (2007). Carbon-supported, nano-structured, manganese oxide composite electrode for electrochemical supercapacitor. *J. Power Sources*, 173 (2), 1024–1028.

Shi, H. (1996). Activated Carbons and Double-Layer Capacitance. *Electrochim. Acta*, 41 (10), 1633–1639.

Simon, P., Gogotsi Y. (2020). Perspectives for electrochemical capacitors and related devices. *Nat. Mater*., 19(11): 1151-1163.

Tarascon, J. M., Armand, M. (2001). Issues and challenges facing rechargeable lithium batteries. *Nature*, 414 (6861), 359–367.

Toupin, M., Brousse, T., Bélanger, D. (2002). Influence of Microstucture on the Charge Storage Properties of Chemically Synthesized Manganese Dioxide. *Chem. Mater*., 14 (9), 3946–3952.

Wang, G., Zhang, L., Zhang, J. (2012). A Review of Electrode Materials for Electrochemical Supercapacitors. *Chem. Soc. Rev.*, 41 (2), 797–828.

Yang, C.-M., Kim, Y.-J., Endo, M., Kanoh, H., Yudasaka, M., Iijima, S., Kaneko, K. (2007). Nanowindow-Regulated Specific Capacitance of Supercapacitor Electrodes of Single-Wall Carbon Nanohorns. *J. Am. Chem. Soc*., 129, 1, 20–21

7. Eskerrak eta oharrak

Eskerrak eman nahi dizkiogu Eusko Jaurlaritzari IT1226-19 erreferientziadun Ikerketa Taldearen laguntzagatik eta Ekonomia eta Lehiakortasun Espaniako Ministerioari PID2019-107468RB-C21 proiektuagatik. Era berean, eskertu beharrekoak ditugu Euskal Herriko Unibertsitateko SGIKER zerbitzu orokorrak, neurketa guztiak han burutu baitira. Azkenik, Jon Rodriguezek Euskal Herriko Unibertsitateari eskerrak ematen dizkio doktorego aurreko kontratuagatik (PIFG20/09).

Txakurren eta Andeetako azerien arteko parasitoen transmisioa ulertu nahian, Txileko paisaia antropikoan

Cevidanes, A.[1,2], Ulloa, C. [3], Di Cataldo, S.[2], Latrofa, M.S.[4], Gonzalez-Acuña, D.†[5], Otranto, D.[4,6], Millán, J.[7, 8, 9 *]

1-Animalia Osasun saila. NEIKER-Nekazaritza Ikerketa eta Garapenerako Euskal Erakundea. Basque Research and Technology Alliance (BRTA). Derio.
2- Programa de Doctorado en Medicina de la Conservación, Facultad de Ciencias de la Vida, Universidad Andrés Bello, Santiago, Chile.
3- Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile, Santiago, Chile
4- Department of Veterinary Medicine, University of Bari "Aldo Moro", Valenzano, Bari, Italy
5- Laboratorio de Parásitos y Enfermedades en Fauna Silvestre, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Concepción, Chillán, Chile
6- Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Science, Bu-Ali Sina University, Felestin Sq., Hamedan, Iran
7- Facultad de Ciencias de la Vida, Universidad Andrés Bello, Santiago, Chile
8- Instituto Agroalimentario de Aragón-IA2 (Universidad de Zaragoza-CITA), Zaragoza, Spain
9-Fundación ARAID, Zaragoza, Spain
aitorcevi@gmail.com

Laburpena

Basa- eta etxe-karniboroek parasitoak parteka ditzakete. Andeetako azerietatik eta landa-txakurretatik jasotako arkakusoak eta kaparrak aztertu ziren Txile erdialdeko paisaia antropizatuan, espezie horien artean parasito horien transmisio interespezifikoa gertatzen den zehazteko. Ektoparasito-espezie bakoitza ostalari-espezie batekin erlazionatu zen argi eta garbi: *Rhipicephalus sanguineus* kaparraren eta *Ctenocephalides* spp arkakusoaren ugaritasuna eta prebalentzia handiagoa izan zen txakurretan. Aitzitik, *Amblyomma tigrinum* kaparrarena eta *Pulex* sp. arkakusoarena azerietan izan zen handiagoa. Arkakuso eta kaparren azterketa epidemiologiko eta genetikoen arabera, ektoparasito horien transmisio interespezifikoa ematen da, baina gutxitan.

Hitz gakoak: kaparrak, arkakusoak, karniboro basatiak, txakurrak, espezie arteko transmisioa

Abstract

Wild and domestic carnivores may share parasites. Fleas and ticks retrieved from Andean foxes and from rural dogs were studied in the anthropized landscapes of central Chile, in order to determine whether interspecific transmission of these parasites between these species occurs. Each ectoparasite species was clearly associated with a host: abundance and prevalence of the tick Rhipicephalus sanguineus *and the flea* Ctenocephalides *spp. was significantly higher in dogs than in foxes. In contrast, abundance and prevalence of the tick* Amblyomma tigrinum *and the flea* Pulex *sp. was significantly higher in foxes than in dogs. Epidemiological and genetic analyses of fleas and ticks suggested that the interspecific transmission of these ectoparasites happen, but infrequently.*

Keywords: ticks, fleas, wild carnivores, dogs, cross-species transmission

1. Sarrera eta motibazioa

Patogeno eta parasito gehienak ostalari-espezie desberdinak infektatzeko gai dira. Bizkarroi batzuk, etxe-abere ugarien artean zirkulatzen dute, eta, noizean behin, espezie "hesia" gurutzatu eta urriagoak diren espezie basatiak kutsa ditzakete. Gaixotasun infekzioso horiek basanimalien heriotza eragin dezakete, populazioa murriztuz (Smith et al., 2009). Baina heriotzaz gain, gaixotasunek ugalketan, migrazioan eta portaeran eragin ditzaketen aldaketen ondorioz ere murriz daitezke populazioak (Bradley and Altizer, 2005; Telfer et al., 2005). Patogeno gehienek ostalari-espezie bat baino gehiago kutsa dezakete (Woolhouse, 2001). Parasitoen eta patogenoen ostalarien populazio-ugaritasunean, infekzioaren prebalentzian eta kutsatzeko gaitasunean aurki daitezkeen desberdintasunen ondorioz, ostalari-espezie bakoitzak modu desberdinean eragin diezaioke ostalari anitzeko patogenoen

transmisioaren dinamikari (Streicker et al., 2013). Beraz, ostalari anitzeko patogeno edo parasitoen biziraupenerako funtsezkoak diren espezie ostalarien identifikazioa ezinbestekoa da gordailuak zeintzuk diren eta gaixotasunaren ekologia ulertzeko (Haydon et al., 2002).

Haydon et al. (2002)-ek honela definitu zuten "gordailu" bat: "epidemiologikoki konektatutako populazio bat edo gehiago, non patogenoa etengabe manten daitekeen eta horietatik beste interesezko populazio batera transmititu daitekeelarik". Beraz, gordailu den populaziotik transmisiorik ez badago, interesezko populazioa ez da gai izango infekzioa mantentzeko (Haydon et al., 2002). Espezie ostalariak zenbait irizpide bete behar ditu patogeno baten gordailu "on" bat izateko. Adibidez, gordailu "ona" den populazioak taldekoia izan, biomasa handia sortu eta iraupen luzekoa izan behar du (Ashford, 1996). Orotariko patogenoak animalia ugarien (etxe-abereen) populazioen barruan mantendu daitezke, eta urriagoak diren animali populazioetara (basanimalietara) "salto" egin (Power and Mitchell, 2004). Kasu batzuetan, patogenoak mantendu egin daitezke populazio batean, ez populazio horren barruan transmisioa ematen delako, baizik eta prebalentzia altua duen populazio-gordailu batetik datorren transmisioa ematen delako (Roelke-Parker et al., 1996; Sillero-Zubiri et al., 1996). Kasu horretan, patogenoak, ostalari-populazioan prebalentzia altura iritsi eta beste populazio ostalarira "salto" egiten du (patogenoen "spillover" izeneko prozesua) (Daszak et al., 2000). Basa-karniboro asko ez dira hain egokiak agente infekziosoak mantentzeko, eta gaitz batzuen epidemiologian, etxe-abere gordailu batetik datozen transmisioak ezinbestekoak dira (Power and Mitchell 2004). Etxe-abereak, askotan, basanimaliak baino ugariagoak dira eta patogeno-gordailu eta mantentze-ostalari gisa jokatzen dute (Daszak et al., 2001). Gainera, etxe-abere eta basanimali batzuen arteko antzekotasun genetikoa "spillover"-ak errazten dituen faktore nagusietako bat da (Pedersen and Fenton, 2007). Ugariak diren txakurrak (*Canis lupus familiaris*), sarritan, basa-karniboroentzako gaixotasun-gordailu izan dira (Cleaveland et al., 2000; Millán et al., 2013; Proboste et al., 2015).

Paisaiaren antropizazioa eta giza populazioaren hazkundea izan dira etxeko animalietan eta gizakietan gaixotasun infekziosoak azaleratu edo berragertzeko bultzatzaileetako batzuk (Bradley and Altizer, 2007; Daszak et al., 2001). Paisaiaren ezaugarrien aldaketak (adib. suntsiketa eta zatiketa) animalien komunitateen konposizioan eta dentsitatean eragina izaten du. Gainera, aldaketa hauen etxe-abere eta basanimalien arteko kontaktu-aukerak areagotzen ditu, hauen artean gaixotasunak kutsatzeko aukera handituz (Deem et al., 2001). Jakina da kanido basatien eta etxe-txakurren arteko kontaktuak patogenoen transmisio-probabilitatea handitzen duela (Nelson et al., 2012; Sabatino et al., 2014; Woodroffe et al., 2012). Transmisio hori bi norabidetan izan daiteke: basanimalietatik abereetara edo alderantziz. Basanimaliak gordailu dituen patogeno zoonotiko potentzialak, gizakiengana "hurbildu" daitezke etxe-abereak "zubi" bezala erabilita.

Gaur egun, txakurra munduko karniboro ugariena da (Daniels and Bekoff, 1989), eta hauen banaketa munduko leku gehienetara zabaldu da (WHO/WSPA, 1990). Txilen, txakurren populazioa 4.059.200 txakurretan zenbatetsi zen (Gompper, 2014), eta librekin mugitzen diren jabedun txakurrak oso arruntak dira (Villatoro et al., 2016). Basanimaliekin izan dezaketen interakzio potentzialaren arabera, txakurrak kategoria desberdinetan sailka daitezke: jabedun maskota-txakurretatik, libreki mugitzen diren jaberik gabeko txakurretara (Bonacic et al., 2019; Vanak and Gompper, 2009). Jabedun txakurrak normalean, osasun kontrolak jasotzen dituzte eta mugimendu mugatua daukate. Aldiz, libreki mugitzen diren landa-txakurrak osasun-kontrol ezak eta jabetza arduragabeak ditu ezaugarri gisa (Bonacic et al., 2019). Txileko Santiago inguruak libreki mugitzen diren txakurren dentsitate oso altuak ditu, herrialdeko altuenak (adibidez, Colina herrian bi biztanleko txakur bat aurki daiteke) (Astorga et al., 2015).

2. Arloko egoera eta ikerketaren helburuak

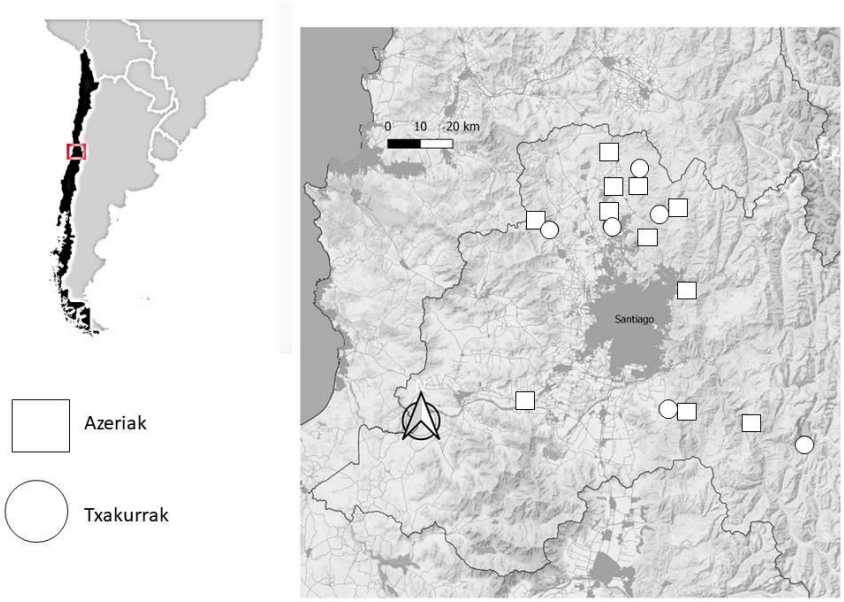
Txile erdialdean, Santiago hiriburuaren inguruetan, txakur askeek eta Andeetako azeriek antropizatutako landa-inguruneak partekatzen dituzte. Horrela, i) txakur askeak Txilen ugari direnez, ii) parasitoen aurkako neurri profilaktikoak gutxitan aplikatzen zaizkienez eta iii) txakurrek eta azeriek landa-eremuetako inguruneak partekatzen dituztenez, txakur eta azerien arteko parasitoen transmisioa espero daiteke.

Horregatik, ikerketa honen helburua txakur *Canis lupus familiaris* (Linnaeus, 1758) (Carnivora: Canidae) eta Andeetako azeri *Lycalopex culpaeus* (Molina, 1782) (Carnivora: Canidae) populazioetan kapar (Acari: Ixodidae) eta arkakusoen (Siphonaptera: Pulicidae) ekologia deskribatzea da transmisioa gertatzen den ala ez zehazteko.

3. Ikerketaren muina

3.1. Laginketa eta parasitoen identifikazioa

Ikerketa 2016 eta 2018 bitartean burutu zen, Txileko Santiagoko eskualde metropolitarreko landa-eremuetan (1. Irudia). Eskualde honek klima mediterraneoa du (uda lehor eta beroekin eta negu euritsuekin) eta landaredi nagusia baso eta sastrakadi esklerofiloak dira. Hirurogeita zazpi Andeetako azeri, babestutako hanka-tranpekin (Oneida Victor Soft Catch nº1.5, USA) harrapatu ziren, eta ketamina-dexmedetomidina konbinazioarekin anestesiatu ziren (Chirife et al., 2020). Laginketa burutu eta anestesiaren efektuetatik errekuperatu ondoren, lekuan bertan askatzen ziren azeriak. Hauetaz gain, animali basatien errekuperazio-zentroetara iritsi ziren beste hamabi azeri ere lagindu ziren. Libreki mugitzeko aukera zeukaten eta tratamendurik jaso ez zuten ehun eta hamaika landa-txakur miatu eta lagindu ziren. Jasotako kapar eta arkakusoak %70eko etanol soluzioan gorde ziren eta laborategian mikroskopio eta lupa estereoskopikoa erabiliz identifikatu ziren gida morfologikoen laguntzaz (Beaucournu and Launay, 1990; Nava et al., 2017). Prebalentzia (P%) eta batezbesteko ugaritasuna (B.U.) kalkulatu ziren parasito-espezie eta ostalari-espezie bakoitzeko. Batezbesteko ugaritasuna aurkitutako parasito kopurua da, aztertutako ostalari kopuruarekin zatituta.



1. Irudia. Ikerketa-eremuen mapa. Karratuak azeriak lagindutako eremuak dira. Borobilak txakurrak lagindutako eremuak dira.

Denera, 574 kapar eta 1018 arkakuso bildu eta identifikatu ziren (1. Taula). Bi kapar-espezie aurkitu ziren: *Amblyomma tigrinum* (Koch, 1844) (Acari: Ixodidae) eta *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (Latreille 1806) (Acari: Ixodidae). Hamalau *Ornithodoros* sp. (Acari: Argasidae) kapar bigun argasido ere aurkitu ziren azeri bakarrean. Azerietan, *A. tigrinum* kaparraren prebalentzia altuagoa izan zen *R. sanguineus* s.l. kaparrarekin alderatuta (%13,9 eta 7,5%, Fisher's $p<0,001$). Bestalde, txakurretan, *R. sanguineus* s.l. kaparraren prebalentzia altuagoa izan zen *A. tigrinum* alderatuta (45,9% eta 1,8%; Fisher's $p<0,001$).

Sei arkakuso-genero (Siphonaptera: Pulicidae) bildu ziren azerietan: *Pulex* sp., *Ctenocephalides* sp., *Equidnophaga gallinacea, Nonnapsulla rothschildi*, *Xenopsylla cheopis* eta *Neotyploceras* sp.. Txakurretan hiru arkakuso-genero (Siphonaptera: Pulicidae) bildu ziren: *Ctenocephalides* sp., *Pulex* sp., eta *Equidnophaga gallinacea*. Kapar eta arkakusoen prebalentzia eta ugaritasuna 1. taulan ikus daitezke. *Pulex* sp. izan zen arkakuso prebalenteena eta ugariena azerietan (kasu guztietan, $X^2 \geq 21,88$, $p<0,001$; Mann-Whitney's U, $z \geq 5,1$, $p<0,0001$). Txakurretan maizen aurkitu zen arkakusoak *Ctenocephalides* generokoak izan ziren. Hauetatik, C*tenocephalides canis* prebalenteagoa zen *C. felis felis* arkakusoarekin alderatuta ($X^2=9,7$, $p<0,01$).

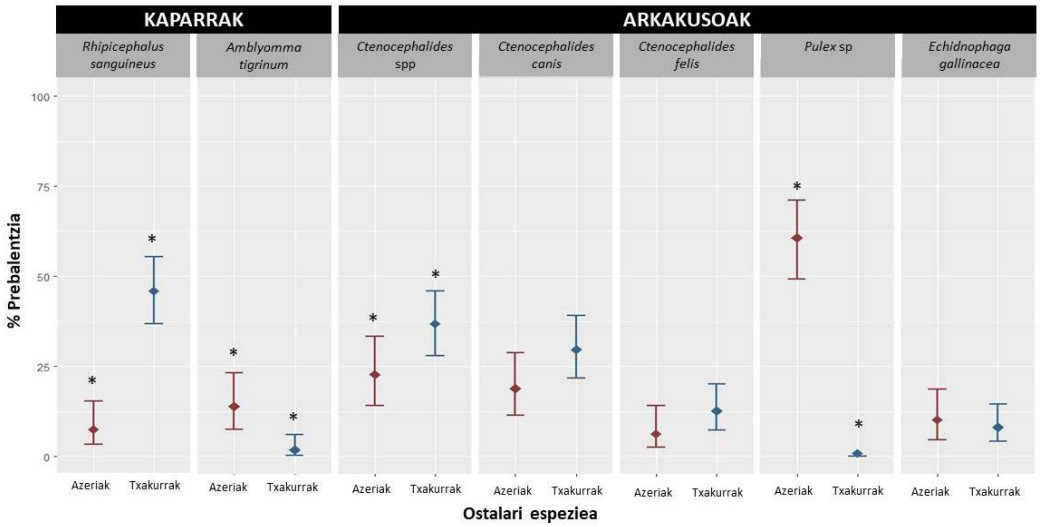
1.Taula. Kapar eta arkakusoen zenbaketa orokorra (Z.O.), prebalentzia (P%) eta batezbesteko ugaritasuna (B.U.) Andeetako azerietan (*Lycalopex culpaeus*) eta txakurretan (*Canis lupus familiaris*).

PARASITOAK	Azeri			Txakur		
	Z.O.	P%	B.U.	Z.O.	P%	B.U
Kaparrak	67	18,9	0,8	507	45,9	4,5
Rhipicephalus sanguineus s.l.	6	7,5	0,07	505	45,9	4,5
Amblyomma tigrinum	61	13,9	0,7	2	1,8	0,01
Arkakusoak	645	73,4	8,1	373	39,6	3,3
Ctenocephalides canis	49	18,9	0,5	192	29,7	1,7
C. felis felis	11	6,3	0,1	52	12,6	0,4
Ctenocephalides sp.	9	3,7	0,1	9	3,6	0,08
Pulex sp.	413	60,7	5,2	3	1,8	0,02
Echidnophaga gallinacea	155	10,1	1,9	88	8,1	0,7

3.2. Ostalariekin asoziazioa eta arrisku faktoreak

Parasito-espezie bakoitzaren prebalentzia eta ugaritasunaren arteko diferentziak "Generalized Linear Mixed Model" (GLMM) bidez aztertu ziren R softwareren "lme4" paketea erabiliz. Prebalentzia agerraldi gisa analizatu zen (0/1) banaketa binomiala eta "logit-link" funtzioa erabiliz. Ugaritasuna (ostalari bakoitzak duen parasito-kopurua) berriz, zenbaketa bezala analizatu zen banaketa binomial negatiboa eta "log-link" funtzioa erabiliz. Eredu lineal mixtoekin ostalari-espeziea (azeri edo txakurra), sexua (arra edo emea), adina (gaztea edo heldua) eta urtaroaren (lehorra edo euritsua) arteko desberdintasunak ikertu ziren. Ausazko efektu gisa ikerketa-eremua erabili zen.

Rhipicephalus sanguineus kaparraren eta *Ctenocephalides* spp. arkakusoen ugaritasuna eta prebalentzia altuagoa izan zen txakurretan azerietan baino, bai *C. canis* (Curtis, 1826) eta *C. felis felis* (Bouché, 1835) ugariagoak izan ziren txakurretan (2. irudia). Bestalde, *Amblyomma tigrinum* kaparraren eta *Pulex* sp. arkakusoaren prebalentzia eta ugaritasuna altuagoak izan ziren azerietan txakurrekin alderatuta (2. irudia).



2. Irudia. Parasitoen prebalentzia ostalarien arabera. Asteriskoek desberdintasun esanguratsuak adierazten dute.

3.3. Karakterizazio molekularra

Parasitoen analisi genetikoa, hauen zikloa eta epidemiologia hobeto ulertzeko ezinbestekoa da. Bi ostalarien artean parasito-espezieak partekatzeaz gain, espezie berdinen genotipoak ere partekatzen zituzten edo ez ikertu genuen. Kapar eta arkakuso batzuk molekularki ikertu ziren. Horretarako DNAren erauzketa burutu zen DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) erabiliz eta lisi bufferra eta K proteinasarekin gau osoko inkubazioa eginez 56ºC-tan. Arkakusoen *cox*2 genea eta kaparren 16S rRNA gene mitokondriala sekuentziatu ziren lehenago deskribatutako protokoloak erabiliz (Liu and Beckenbach, 1992; Lv et al., 2013). Nukleotidoen sekuentzia-motaren (ntST) identifikazioa DnaSP6 softwarea erabiliz egin ziren. Lortutako sekuentzia berri guztiak GenBank-en erregistratu ziren MW509948-MW509951, MW509953-MW509958, MW526403-MW526416 sarbide zenbakiekin. Ektoparasitoen sekuentzien arteko erlazio filogenetikoak, gene bakoitzarentzat, MEGA 6.0 erabiliz gehienezko probabilitate-metodoaren eta Tamura-Nei ereduaren bidez ondorioztatu ziren. Sekuentzia-moten sareak eraiki ziren PopART softwarean (Population Analysis with Reticulate Trees). Kapar eta arkakusoen egitura genetikoa txakurren eta azerien artean ebaluatu zen DnaSP6ean inplementatutako nukleotidoen sekuentzian oinarritutako hurbileneko bizilagunen estatistikak erabiliz.

Kapar eta arkakusoen gehiengo ntST ugarienak partekatuak aurkitu ziren txakur eta azerien artean eta ez zen egituraketa genetikorik aurkitu ostalariak kontuan hartuta. Beraz, parasito-espezieak partekatzeaz gain, parasito hauen genotipoak ere partekatzen zituzten.

4. Ondorioak

Atzemandako arkakuso eta kapar gehienek banaketa kosmopolita dute. Hala ere, ikerketa honek erakusten du *R. sanguineus* s.l., *A. tigrinum* eta *P. irritans* espezieek lotura estua dutela ostalari-espezie jakin batentzat. Asoziazio hau, ingurunearen egokitasunagatik izan daiteke, funtsezkoa baita kapar eta arkakusoek ziklo biologikoa garatu eta betetzeko. Adibidez, *A. tigrinum*-ek hegazti basatiak eta karraskariak behar ditu larbak eta ninfak garatzeko (González-Acuña et al., 2004; Nava et al., 2006), eta, beraz, azeriak bizi diren ingurunean zikloa burutzeko aukera gehiago dute. *Rhipicephalus sanguineus* s.l. kaparrean, aldiz, portaera endofiloa ohikoa da, etxe-inguruko lurrak eta arroka-tarteak gustatzen baitzaizkio (Dantas-Torres, 2008). Beraz, txakurrek lo egiten duten inguruak egokiak dira zikloa burutzeko.

Ctenocephalides arkakusoaren zikloaren zati bat animaliek lo egiten duten lurrean gertatu ohi da, etxe barruan edo inguruetan (Durden and Hinkle, 2019). Horregatik, *C. canis* eta *C. felis* arkakusoek aukera gutxiago dituzte azeri basatiak parasitatzeko. Hala ere, etxe-inguruak *P. irritans* arkakusoarentzat egokiak diren arren, azterketa honetan ikusitako emaitzek adierazten dute, kasu batzuetan, ostalari-parasito asoziazioak eta koeboluzio-erlazioak, arkakusoen ingurumen-egokitasunak baino eragin handiagoa izan dezaketela.

Laburbilduz, analisi genetikoarekin bateratuta, *R. sanguineus* s.l. eta *Ctenocephalides* spp. parasitoen kasuan esan daiteke txakurrek azerientzako mantentze edo gordailu bezala jokatzen dutela eta ektoparasito horien transmisioak txakurretatik azerietara gertatzen direla. Azeriak, aldiz, *A. tigrinum* eta *P. irritans* parasitoen ostalari naturalak dirudite, lehenago ikusi den bezala txakurrik ez dagoen Patagoniako lekuetan bizi baitira (Millán et al., 2019), eta libreki mugitzen diren txakurrak parasito-espezie hauekin noizbehinka infekta daitezke.

5. Etorkizunerako planteatzen den norabidea

Bi ostalari hauen artean, arkakuso eta kaparren transmisioa ematen da, baina uste baino mugatuagoa da. Mugatua izan arren, partekatze honek kezka pixka bat sortaraz dezake. Batez ere, ektoparasito hauek gaixotasunak transmititzeko gai direlako. Oraindik ikertzeko dago, bektore bidez kutsatutako patogenoek azeriak gaixotzeko duten gaitasuna, baina horrelako patogenoak birusekin koinfekzioan egonda (txakur-mukieria sortzen duen birusarekin adibidez) heriotza-tasa handiak eragin ditzakete karniboro basatien populazioetan. Bestalde, Txilen, azerien populazioa txakurrena baino txikiagoa izan arren, ikusi dugu transmisioaren norabidea azerietatik txakurretara ere izan daitekeela, parasito batzuentzako. Egoera horrek, azerien patogeno zoonotiko potentzialak gizakiengana “hurbildu” daitezke txakurra “zubi” bezala erabilita.

6. Erreferentziak

Ashford, R.W., 1996. Leishmaniasis reservoirs and their significance in control. *Clin. Dermatol*. 14, 523–532.

Astorga, F., Escobar, L.E., Poo-Muñoz, D.A., Medina-Vogel, G., 2015. Dog ownership, abundance and potential for bat-borne rabies spillover in Chile. *Prev. Vet. Med*. 118, 397–405.

Beaucournu, J.C., Launay, H., 1990. *Faune de France 76: les Puces de France et du Bassin méditerranéen occidental*. Fédération française des Sociétés de Sciences Naturelles, Paris.

Bonacic, C., Almuna, R., Ibarra, J.T., 2019. Biodiversity conservation requires management of feral domestic animals. *Trends Ecol. Evol*. 34, 683–686.

Bradley, C. A., Altizer, S., 2005. Parasites hinder monarch butterfly flight: implications for disease spread in migratory hosts. *Ecol. Lett*. 8, 290–300.

Bradley, C.A., Altizer, S., 2007. Urbanization and the ecology of wildlife diseases. *Trends Ecol. Evol*. 22, 95–102.

Chirife, A.D., Cevidanes, A., Millán, J., 2020. Effective field immobilization of Andean fox (*Lycalopex culpaeus*) with Ketamine-Dexmedetomidine and Antagonism with Atipamezole. *J. Wildl. Dis*. 56, 447–451.

Cleaveland, S., Appel, M.G.J., Chalmers, W.S.K., Chillingworth, C., Kaare, M., Dye, C., 2000. Serological and demographic evidence for domestic dogs as a source of canine distemper virus infection for Serengeti wildlife. *Vet. Microbiol*. 72, 217–227.

Daniels, T.J., Bekoff, M., 1989. Population and Social Biology of Free-Ranging Dogs, *Canis familiaris*. J. *Mammology* 70, 754–762.

Dantas-Torres, F., 2008. The brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae): from taxonomy to control. *Vet. Parasitol*. 152, 173–85.

Daszak, P., Cunningham, A.A., Hyatt, A.D., 2001. Anthropogenic environmental change and the emergence of infectious diseases in wildlife. *Acta Trop*. 78, 103–116.

Daszak, P., Cunningham, A.A., Hyatt, A.D., 2000. Emerging Infectious Diseases of Wildlife - Threats to Biodiversity and Human Health. *Science* 287, 443–449.

Deem, S.L., Karesh, W.B., Weisman, W., 2001. Putting Theory into Practice : Wildlife Health in Conservation. *Conserv. Biol*. 15, 1224–1233.

Durden, L.A., Hinkle, N.C., 2019. Fleas (Siphonaptera*)*, in: Mullen, G.R., Durden, L.A. (Eds.), *Medical and Veterinary Entomology*. Academic Press, London, pp. 145–169.

Gompper, M.E., 2014. *Free-Ranging Dogs and Wildlife Conservation*. Oxford University Press, New York.

González-Acuña, D., Venzal, J., Skewes-Ramm, O., Rubilar-Contreras, L., Daugschies, A., Guglielmone, A.A., 2004. First record of immature stages of *Amblyomma tigrinum* (Acari: Ixodidae) on wild birds in Chile. *Exp. Appl. Acarol*. 33, 153–156.

Haydon, D.T., Cleaveland, S., Taylor, L.H., Laurenson, M.K., 2002. Identifying reservoirs of infection: A conceptual and practical challenge. *Emerg. Infect. Dis*. 8, 1468–1473.

Liu, H., Beckenbach, A., 1992. Evolution of the Mitochondrial Cytochrome Oxidase II Gene among 10 Orders of Insects. *Mol. Phylogenet*. Evol. 1, 41–52.

Lv, J., Wu, S., Zhang, Y., Zhang, T., Feng, C., Jia, G., Lin, X., 2013. Development of a DNA barcoding system for the Ixodida (Acari: Ixodida). *Mitochondrial DNA.* 25, 142–9.

Millán, J., Chirife, A.D., Kalema-Zikusoka, G., Cabezón, O., Muro, J., Marco, I., Cliquet, F., León-Vizcaíno, L., Wasniewski, M., Almería, S., Mugisha, L., 2013. Serosurvey of Dogs for Human, Livestock, and Wildlife Pathogens, Uganda. *Emerg. Infect. Dis*. 19, 680–682.

Millán, J., Travaini, A., Cevidanes, A., Sacristán, I., Rodríguez, A., 2019. Assessing the natural circulation of canine vector-borne pathogens in foxes, ticks and fleas in protected areas of Argentine Patagonia with negligible dog participation. *Int. J. Parasitol. Parasites Wildl*. 8, 63–70.

Nava, S., Mangold, A.J., Guglielmone, A.A., 2006. The natural hosts of larvae and nymphs of Amblyomma tigrinum Koch, 1844 (Acari: Ixodidae). *Vet. Parasitol*. 140, 124–32.

Nava, S., Venzal, J.M., González-Acuña, D. Martins, T.F., Guglielmone, A.A., 2017. *Ticks of the Southern Cone of America. Diagnosis, Distribution and Hosts with Taxonomy, Ecology and Sanitary Importance*. Elservier, Academic Press, London.

Nelson, B., Hebblewhite, M., Ezenwa, V., Shury, T., Merrill, E.H., Paquet, P.C., Schmiegelow, F., Seip, D., Skinner, G., Webb, N., 2012. Prevalence of Antibodies to Canine Parvovirus and Distemper Virus in Wolves in the Canadian Rocky Mountains. *J. Wildl. Dis.* 48, 68–76.

Pedersen, A.B., Fenton, A., 2007. Emphasizing the ecology in parasite community ecology. *Trends Ecol. Evol*. 22, 133–9.

Power, A.G., Mitchell, C.E., 2004. Pathogen Spillover in Disease Epidemics. *Am. Nat*. 164 Suppl, S79–S89.

Proboste, T., Kalema-Zikusoka, G., Altet, L., Solano-Gallego, L., Fernández De Mera, I.G., Chirife, A.D., Muro, J., Bach, E., Piazza, A., Cevidanes, A., Blanda, V., Mugisha, L., de la Fuente, J., Caracappa, S., Millán, J., 2015. Infection and exposure to vector-borne pathogens in rural dogs and their ticks, Uganda. *Parasit. Vectors* 8, 306.

Roelke-Parker, M., Munson, L., Packer, C., Kock, R., Cleaveland, S., Carpenter, M., O'Brien, S., Pospischil, A., Hofmann-Lehmann, R., Lutz, H., Mwamengele, G., Mgasa, M., Machange, G., Summers, B., Appel, M., 1996. A canine distemper virus epidemic in Serengeti lions (Panthera leo). *Nature*. 379(6564), 441-445.

Sabatino, D. Di, Lorusso, A., Francesco, C.E. Di, Gentile, L., Pirro, V. Di, Bellacicco, A.L., Giovannini, A., Francesco, G. Di, Marruchella, G., Marsilio, F., Savini, G., 2014. Arctic Lineage-Canine Distemper Virus as a Cause of Death in Apennine Wolves (*Canis lupus*) in Italy. *PLoS One* 9, e82356.

Sillero-Zubiri, C., King, A.A., Macdonald, D.W., 1996. Rabies and Mortality in Ethiopian Wolves (*Canis simensis*). *J. Wildl. Dis*. 32, 80–86.

Smith, K.F., Acevedo-Whitehouse, K., Pedersen, A.B., 2009. The role of infectious diseases in biological conservation. *Anim. Conserv*. 12, 1–12.

Streicker, D.G., Fenton, A., Pedersen, A.B., 2013. Differential sources of host species heterogeneity influence the transmission and control of multihost parasites. *Ecol. Lett*. 16, 975–984.

Telfer, S., Bown, K.J., Sekules, R., Begon, M., Hayden, T., Birtles, R., 2005. Disruption of a host-parasite system following the introduction of an exotic host species. *Parasitology* 130, 661–668.

Vanak, A.T., Gompper, M.E., 2009. Dogs Canis familiaris as carnivores: their role and function in intraguild competition. *Mamm. Rev.* 39, 265–283.

Villatoro, F.J., Sepúlveda, M.A., Stowhas, P., Silva-Rodríguez, E.A., 2016. Urban dogs in rural areas: Human-mediated movement defines dog populations in southern Chile. *Prev. Vet. Med*. 135, 59–66.

WHO/WSPA, 1990. *Guidelines for Dog Population Management*, WHO/ZOON/90.166. Geneva.

Woodroffe, R., Prager, K.C., Munson, L., Conrad, P. a, Dubovi, E.J., Mazet, J. a K., 2012. Contact with domestic dogs increases pathogen exposure in endangered African wild dogs (*Lycaon pictus*). *PLoS One* 7, e30099.

Woolhouse, M.E.J. , Taylor, L. H., & Haydon, D. T, 2001. Population Biology of Multihost Pathogens. *Science* . 292, 1109–1112

7. Eskerrak eta oharrak

Artikulu hau Daniel González-Acuñari eskainita dago. Ikerketa hau Fondecyt 1161593 eta "Fondo para la iniciación a la investigación UNAB" -ek finantzatu dute. Ikerketa hau Andres Belloko Unibertsitateko bioetikako komisioak onartu zuen 08/2016 baimenarekin. Nekazaritza eta Abeltzaintza Zerbitzuak harrapatzeko baimenak eman zituen (Ebazpenak: 1878-2016, 4469-2016, 3379-2017, 3380-2017, 8153-2017, 2655-2018, 4454-2018). Eskerrak eman nahi dizkiegu Irene Sacristán, Carla Tagini, Nina Rygh eta Andrea D. Chiriferi; Unidad de Rehabilitación de Fauna Silvestre UNAB / Buin Zoo eta Servicio Agricola Ganadero-ko Fauna Zerbitzuko Katherine Daza, Carlos José Tellería eta Maximiliano Larraín-i (Oficina Agricola de Colina) laginketan laguntzeagatik.

Artikulu hau Aitor Cevidanes-en doktoretza-tesiko kapitulu bat da eta *Medical and Veterinary Entomology* aldizkarian argitaratzeko onartua izan da. Lana Txileko Universidad Andrés Bello-n burutu da gehienbat baina zati bat Aitor Cevidanes-ek doktoregoan zehar egindako egonaldi internazional batean burutu da. Egonaldia University of Bari "Aldo Moro" –ko "Veterinary Medicine" departamentuan izan zen Italian.

Nikel estaldura bainuetan hipofosfito edukiaren kontrola metodo zinetiko eta kolorimetriko baten bitartez

Albizu, G., Gutierrez, M., Ostra, M. eta Vidal, M.
Kimika Aplikatua Saila, Kimika Fakultatea, Euskal Herriko Unibertsitatea, 20018 Donostia
gorka.albizu@ehu.eus

Laburpena

Lan honetan metodo kolorimetriko baten garapena azaltzen da nikel estaldura bainuetan hipofosfitoa determinatzeko molibdeno urdinaren erreakzioaz baliatuz. Horretarako espektrofotometria ultramore-ikuskorra erabili da eta ioi-kromatografia erreferentziazko teknika gisa. Kimiomtetria ere erabili da, zehazki PLS-a, hipofosfitoaren edukia modelatzeko, laginetan interferentziak egon daitezkeen arren.

Hitz gakoak: Hipofosfitoa; Nikel-estaldura bainua; Zinetika; Molibdeno urdina

Abstract

This work explains the development of a colorimetric method to determine hypophosphite in nickel plating baths by the molybdenum blue reaction and using ultraviolet-visible spectrophometry. Ion-chromatography have been used as the reference technique. Chemometry, specifically PLS, has also been used to model the hypophosphite content, although there may be interferences in the sample

Keywords: Hypophosphite; Nickel Plating Baths; Kinetics; Molybdenum blue

1. Sarrera eta motibazioa

Nikela estalduren industrian gehien erabiltzen den metaletako bat da; korrosioarekiko eta urradurarekiko duen erresistentzia handiagatik, bere ezaugarri ferromagnetikoengatik eta estaldurari eskaintzen dizkion propietate estetikoengatik (Kanani, 2004). Horregatik guztiagatik, nikelezko estaldurak hainbat sektoretan erabiltzen dira, hala nola, informatikan, elektronikan edo automobilgintzan (Mallory eta Hajdu, 1990).

Nikel estaldura prozesua deposizio bainuetan egiten da, non metala Ni(II)-tik Ni(0)-ra erreduzitzen den estali beharreko gainazalean ezartzeko. Emaitza egokia izan dadin, bainuen parametroak kontrolatu behar dira, esaterako, tenperatura, pH-a edo agitazioa. Era berean, oso garrantzitsua da bainua osatzen duten konposatu guztien kontzentrazioaren etengabeko kontrola izatea.

Nikelezko estaldurak lortzeko bi modu daude. Alde batetik nikelatze elektrolitikoa (*electroplating*) non anodo baten bidez korrontea pasatzen den eta elektrolitoan (bainuan) dauden Ni(II)-ak erreduzitzen diren katodo batean. Normalean katodoa estali nahi den xafla metalikoa da. Bestalde, estaldura kimikoarekin (*electroless*), ez da beharrezkoa kanpotik korrontea pasatzea bainuan zehar. Kasu honetan, prozesu autokatalitiko baten bidez, erreduktore batek nikelari behar dituen elektroiak ematen dizkio, metala erreduzitu eta estali nahi den gainazala estaltzeko, energia elektrikorik erabili behar izan gabe (Hari Krishnan et al., 2006).

Nikel-bainuetan gehien erabiltzen den erreduktorea sodio hipofosfitoa (NaH_2PO_2) da, merkea eta korrosioarekiko erresistentzia ona eskaintzen duelako (Sudagar et al., 2013). Hipofosfitoa erabiliz Ni-P aleazioak lortzen dira; hau da, metala ez ezik, estali nahi den gainazalean fosforoa ere jalkitzen da. Beraz, erreduktorearen kontzentrazioak, estalduren propietateak determinatuko ditu, eta hori dela eta oso garrantzitsua da hipofosfito kontzentrazioa jarraitzea eta kontrolatzea (Mallory eta Hajdu, 1990).

Hipofosfitoak ($H_2PO_2^-$) metala erreduzitzean fosfitoa (HPO_3^{2-}) sortzen du oxidazio-produktu gisa (Stankiewicz et al., 2013). Ondorioz, erreduktorearen kontzentrazioa gutxitzen joaten da estaldurak egiten direnean, eta hipofosfitoaren kontzentrazioa estaldura bakoitzaren ondoren doitu behar da. Bestalde, fosfitoa etengabe metatzen da bainuetan, eta kontzentrazioa handitu

ahala, disoluzioan dauden beste konposatu batzuekin lehiatzen hasten da, bainua baztertu behar izateraino.

2. Arloko egoera eta ikerketaren helburuak

Estalduren industrian bainuan dauden konposatuen kontrola bolumetria bidez egiten da normalean. Metodo hauek motelak izan ohi dira eta erreaktibo bolumen handiak kontsumitzen dituzte. Horregatik, interesgarria da determinazio horiek egiteko metodo errazagoak garatzea. Helburu horrekin, ikerketa taldeak nikel bainuetan nikela, sulfatoa eta amonioa irudi digitalen analisi bidez kontrolatzeko metodo bat garatu zuen (Bordagaray et. al., 2020).

Hipofosfitoaren kasuan, determinazioa oxidazio-erredukzio balorazio baten bitartez egiten da industrian. Balorazio horretan, hipofosfitoak gehiegizko iodoarekin (I_2) erreakzionatzen du, eta soberan gelditzen den iodoa sodio tiosulfatoarekin ($Na_2S_2O_3$) baloratzen da (Rossman et al., begiratua: 2021/03/08), iodoak almidoiarekin erreakzionatzean ematen duen kolore urdina desagertzen den arte. Metodo hau prozedura luzea da, izan ere, hipofosfitoaren oxidazio osoa emateko, hipofosfitoaren eta iodoaren nahasketa iluntasunean utzi behar da 30 minutuz. Hona hemen gertatzen diren erreakzioak:

$$PO_2^{3-} + I_2 + H_2O \leftrightarrow PO_3^{3-}\ 2I^- + 4H^+ \quad (1)$$

$$2S_2O_3^{2-} + I_2 \leftrightarrow S_4O_6^{2-}\ 2I^- \quad (2)$$

Itxarote baharraz gain, balorazioan lagin kantitate asko behar da (5 mL), horrek, gainera, erreaktibo kantitate handia eskatzen du eta ondorioz hondakin asko sortzen da.

Hipofosfitoa determinatzeko beste metodo bat ioi-kromatografia da (K.L. Foster et. al., 2004). Ioi-kromatografia ioien determinaziorako erabiltzen den teknika bat da eta ioi-trukean oinarrituta dago. Fase mugikor baten laguntzaz lagina fase geldikor batetik pasarazten da, eta ioiak fase geldikor horrekiko duten afinitatearen arabera aterako dira. Hau da, zenbat eta afinitate handiagoa, orduan eta beranduago pasatuko da ioia detektagailutik. Ioi-kromatografiaren eragozpenik nagusiena da garestia dela, erabili behar diren tresnak garestiak baitira.

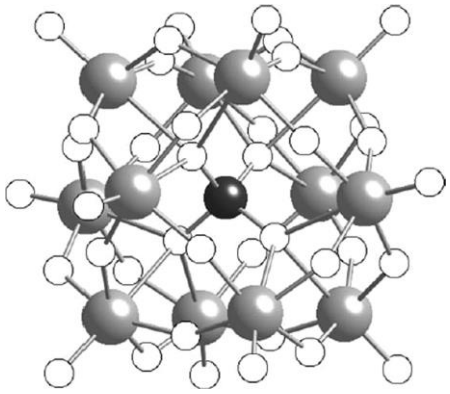
Gaur egun estalduren industrian hipofosfitoa determinatzeko erabiltzen diren teknika eta metodoek dituzten eragozpenak ikusita, interesgarria da metodo sinple eta azkarrago bat garatzea, eta anioia kontrolatzeko erreaktibo askorik behar ez duena.

Helburu horrekin, molibdeno urdina izeneko erreakzioan oinarritutako metodo kolorimetriko bat garatu da. Erreakzio hau fosfatoak (PO_4^{3-}) determinatzeko asko erabiltzen den erreakzioa da. Erreakzio honek bi etapa ditu: lehenik, molibdenoa fosfatoaren oxigenoekin elkartzen da konplexu bat eratzeko (1. irudia), kolore horikoa eta absortibitate txikia daukana. Horregatik, bigarren pauso bat egiten da, eta konplexuko molibdeno batzuk Mo(VI)-tik Mo(V)-era erreduzitzen dira, kolore urdineko konplexu askoz ere biziago bat sortuz, Ultramore-Ikuskor espektrofotometria (UV-Vis) bidez determinazioa ahalbidetzen duena. Hona hemen prozesu honen bi etapak (Nagul et al., 2015):

$$PO_4^{3-} + 12MoO_4^{2-} + 27H^+ \leftrightarrow H_3PO_4(MoO_3)_{12} + 12H_2O \quad (3)$$

$$H_3PMo(VI)_{12}O_{40} + \text{erreduktorea} \leftrightarrow [H_4PMo(VI)_8Mo(V)_4O_{40}]^{3--} \quad (4)$$

1. irudia. P(V)-Mo konplexuaren egitura. Esfera beltzak, grisak eta zuriak P, Mo eta O dira, hurrenez hurren (Nagul et al., 2015).



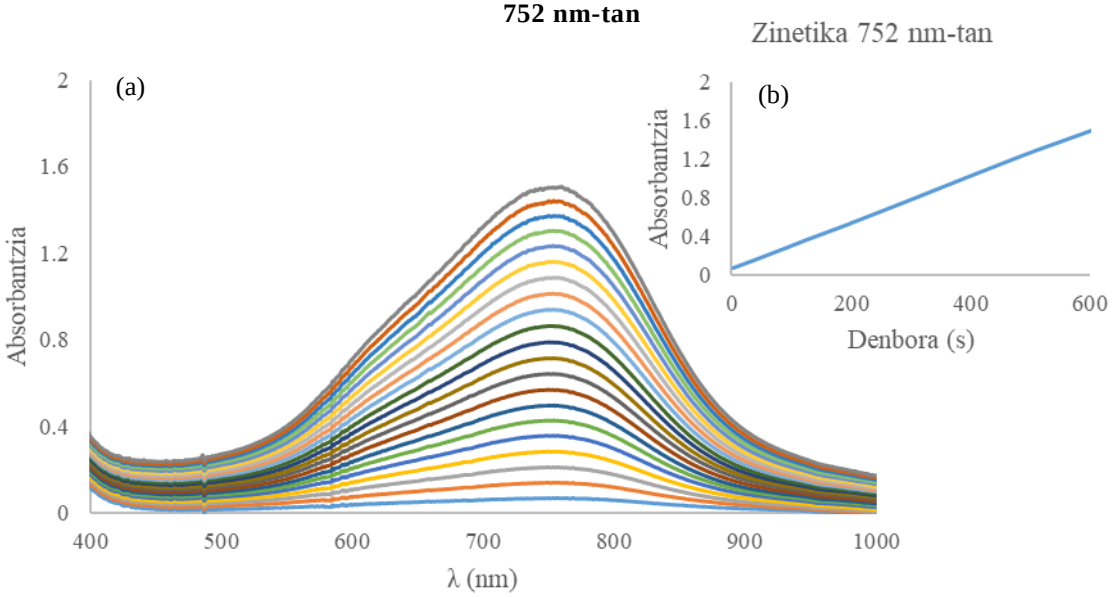
Erreakzio horrekin hipofosfitoa determinatzeko erreferentziak aurki daitezke bibliografian. Horietako batean fosfatoen interferentziak ezinezkoa egiten du hipofosfitoaren kontzentrazioa aurresatea (Scanzillo, 1954), eta beste batean (Anton, 1965) 30 minutu itxaron behar dira determinazioa egiteko. Horregatik, lan honetan hipofosfitoaren analisia optimizatu nahi da molibdeno urdina erreakzioa oinarri hartuta, azido klorhidrikoa (HCl) erabiliz erreakzio ingurunea azidoa izan dadin, eta sodio sulfitoa (Na_2SO_3) erreduktore gisa.

3. Ikerketaren muina

3.1. Hipofosfitoaren determinazioa

Lehenik eta behin, hipofosfitoaren determinazioa egiteko baldintzak optimizatu dira. Horretarako, HCl kontzentrazio optimoa eta neurketa-denbora zehaztu dira, azken hori erreakzioa ez delako berehalakoa eta zinetika baten bidez jarraitu behar baita. 2.(a) irudian, 0.8 mM hipofosfito neurketa baten espektroak agertzen dira, 10 min-tan zehar 30 segunduro neurtu ondoren. 2.(b) irudian, berriz, zinetikaren kurba ikus daiteke absorbantzia maximoan, hau da, 752 nm-tan.

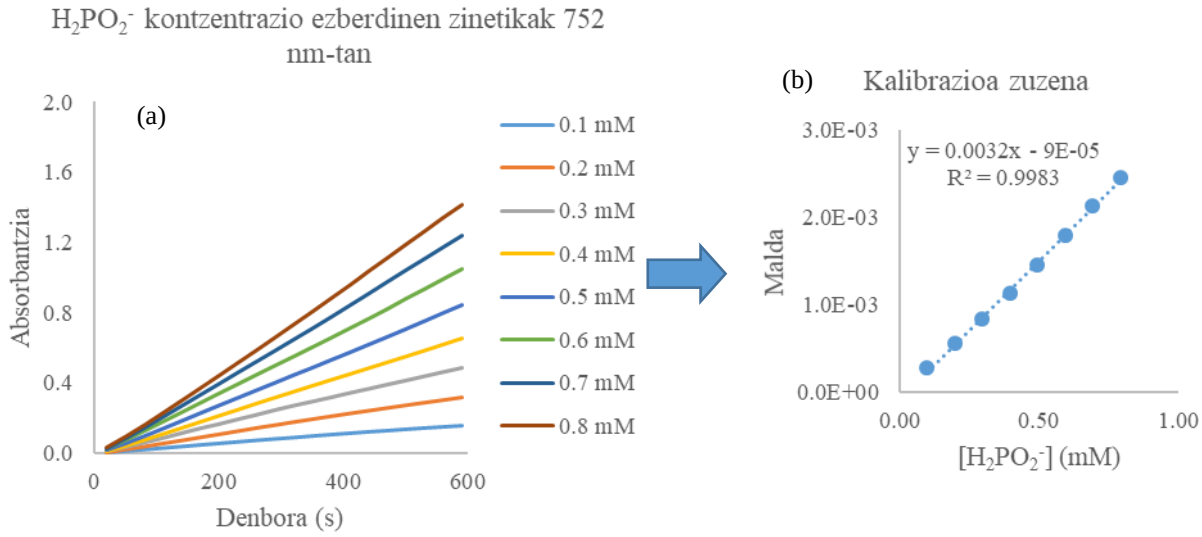
2. irudia. (a) Espektroak denbora desberdinetan, 0.8 mM hipofosfito patroiarentzat. (b) Zinetika 752 nm-tan



Aurreko irudian ikus daitekeen bezala, hipofosfitoaren eta molibdenoaren arteko erreakzioak 752 nm-tan absorbantzia maximo dauka, eta gainera, erreakzioa berehalakoa ez denez, denborak aurrera egin ahala konplexuak kolore gehiago hartzen du. Horregatik, kalibrazio zuzen bat

egitea erabaki da, seinale gisa 752 nm-tako zinetikaren malda erabiliz, 3. irudian ikusten den bezala.

3. irudia. (a) Hipofosfito kontzentrazioaren araberako zinetikak 752 nm-tan. (b) 752 nm-tako maladak erabiliz eraikitako kalibrazio zuzena.



3.(b) irudian ikus daitekeenez, modu honetan hipofosfitoa determinatzeko kalibrazio zuzen on bat lortu da. Lortutako detekzio-muga (LOD, *Limit of Detection*) 0,03 mM-ekoa da, eta tarte lineala 0,1 – 0,8 mM bitartekoa. Gainera, doitasuna eta zehaztasuna onak izan dira (% 1,1 - % 3,2 eta % 1,2 - % 5,5 artekoak hurrenez hurren).

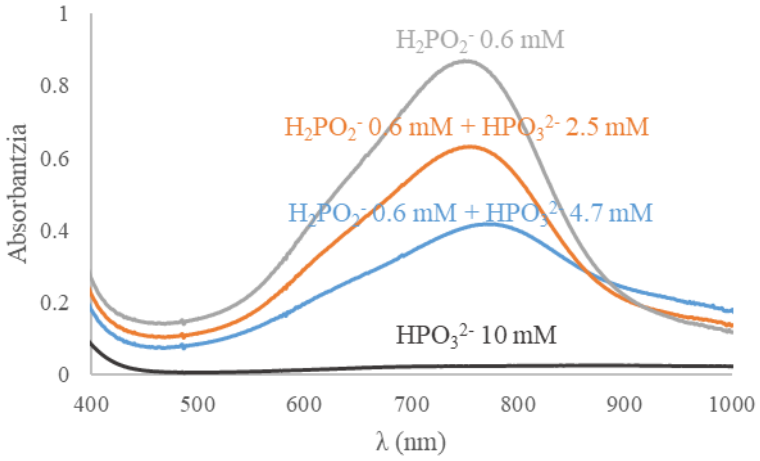
Emaitza horiek ikusita esan daiteke metodo kolorimetriko bat garatu dela hipofosfitoaren kontzentrazioa modu zehatz batean neurtu ahal izateko. Gainera, oso hondakin gutxi sortzen dira, guztira 2,6 mL, erreakzioa zuzenean kubetan gauzatzen baita, eta estalduren industrian tradizionalki erabiltzen diren metodoak baina azkarragoa da.

3.2. Fosfitoaren interferentzia

Sarreran azaldu den bezala, hipofosfitoaren degradazio-produktua fosfitoa da, eta nikel-bainuetan etengabe metatzen da. Anioi honek molibdenoarekin konplexu koloredunik eratzen ez duen arren, eta hasiera batean hipofosfitoaren determinazioan eraginik izango ez duela eman dezakeen arren, esperimentalki fosfitoaren presentziak molibdenoak eta hipofosfitoak osatzen duten konplexu urdinaren absorbantzia maximoa murrizten duela frogatu da. 4. irudian fosfitoak (HPO_3^{2-}) berez kolorea xurgatzen ez duela ikus daiteke, hipofosfitoak ($H_2PO_2^-$) 752 nm-tan maximo ematen duen bitartean. Aldiz, fosfitoa gehitzeak maximoa gutxitzea eragiten duela ere ikus daiteke, eta gainera, eskuinerantz desplazatzen dela.

Fosfitoak eragiten dituen aldaketek nikel-bainuetan hipofosfitoa determinatzeko arazo bat suposatzen dute. Lehen neurketetan fosfito askorik ez dagoen arren, bainua erabiltzen den heinean geroz eta gehiago eratzen da, eta ondorioz ezin da hipofosfitoaren determinazioa egin 752 nm-ko malda erabiliz. Horregatik guztiagatik, kontzentrazio-matrize batekin lan egitea erabaki da; matrize horretan, hipofosfito kontzentrazioa ez ezik, fosfitoak espektroei ematen dien aldakortasuna ere gehitu nahi izan da. Horrela, 47 puntuko matrize bat osatu zen, non hipofosfitoaren kontzentrazioa 0,2 mM-etik 1 mM-era doan, eta fosfitoarena 0,4 mM-etik 6 mM-era.

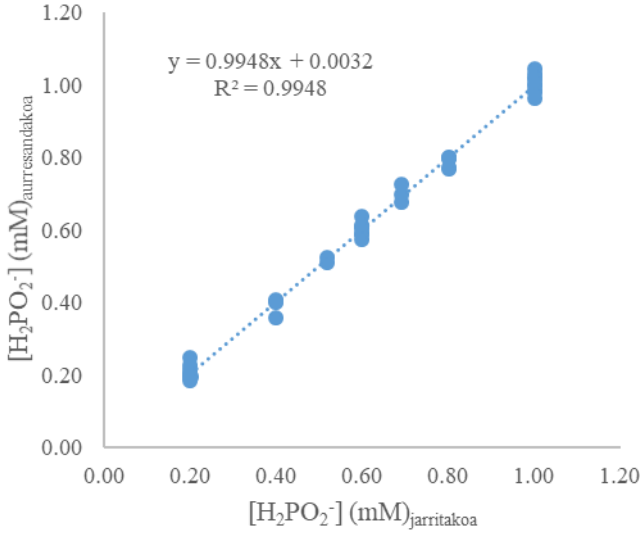
4. irudia. Fosfitoaren interferentziak espektroan sortzen dituen aldaketak.



Kasu honetan hipofosfito-kontzentrazioaren eta zinetikaren maldaren arteko erlazio lineala galtzen denez, erregresio lineala baino erregresio-eredu konplexuagoak bilatu behar dira, PLS-a bezalakoa. PLS (*Partial Least Squares Regression*) edo Minimo Karratu Partzialen Bidezko Erregresioa aldagai anitzeko kalibrazio teknika bat da eta datu multzoen arteko erlazioak aurkitzeko balio du. Kasu honetan espektroek eta zinetikek ematen duten informazioa hipofosfito edukiarekin erlazionatzea bilatuko da. Horrela, laginen kontzentrazioa aurresatea ahalbidetzen duen kalibrazio-eredu bat sortzen da.

Eredu onena 400 eta 1000 nm arteko espektro-eremua eta 10 minutuko zinetikak erabiliz lortu da. 5. irudian erakusten den kalibrazio ereduak aurresandako eta erreferentziazko balioen artean % 3,1eko errore erlatiboa du, eta detekzio-muga (LOD, *Limit of Detection*), fidagarritasunez detekta daitekeen kontzentraziorik txikiena, 0,06 mM-ekoa da. Detekzio-muga kalkulatzeko 5. irudian erakusten den maldaren (aurresandako kontzentrazioa vs jarritako kontzentrazioa) desbideratzea erabili da. Metodoaren tarte lineala 0,2 eta 1 mM artekoa da.

5. Irudia. PLS eredua erabilita hipofosfito eta fosfito kontzentrazio ezagunak dituzten patroien aurresandako kontzentrazioak, erreferentziazko kontzentrazioaren aurrean.

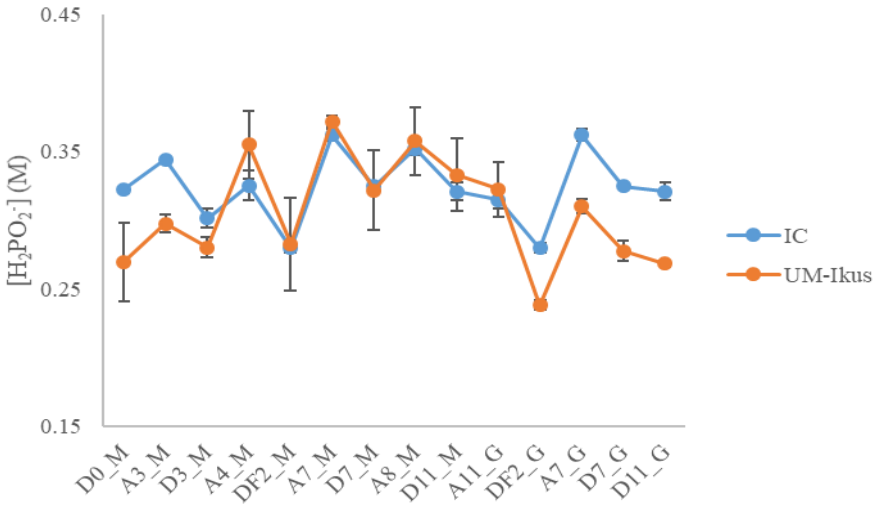


Bestalde, doitasuna eta zehaztasuna hiru egun ezberdinetan neurtutako zinetikekin kalkulatu dira. Egun bakoitzean eta sei aldiz 0,4 eta 0,8 mM kontzentrazioko patroiak prestatu eta neurtu dira, fosfito kontzentrazio desberdinak gehituz (1 mM eta 3 mM). Doitasuna desbideratze

estandarraren bidez kalkulatu da eta zehaztasuna lortutako kontzentrazioa balio teorikoarekin konparatuz.. Doitasunean lortutako desbideratze estandar erlatiboak % 7,6 eta % 25,0 artean daude; eta zehaztasunaren kasuan erroreak % 8,5 eta % 23,0 artean. Kasu guztietan, errore altuak lortzen dira gehitutako fosfitoa 3 mM denean. Hori normala da, fosfito kontzentrazio altuagoetan honen interferentzia handiagoa baita, eta ondorioz, determinazioa zailagoa.

Aldagai anitzeko kalibrazio-eredua erabiliz lortutako erroreak maldarekin lortutakoak baino handiagoak izan arren, modu horretan hipofosfito kontzentrazioaren jarraipena egin daiteke ingurunean fosfitoa egon arren. Horregatik, eredu hau laborategian prestatutako Ni-P bainu batetik ateratako laginetan hipofosfitoa determinatzeko erabili da, eta erreferentzia-metodo gisa, metodoaren zehaztasuna balioztatzeko, ioi-kromatografia. 6. irudian bi teknikak aplikatuz lortutako emaitzak laburbildu dira.

6. irudia. Ioi-kromatografia (IC) eta espektrofotometria ultramore-ikuskorraren bidez aurreesandako laginen hipofosfito kontzentrazioa eta bakoitzaren desbiderazio estandarra.



6. irudian ikus daitekeenez, lagin batzuk berdin aurreikusten dira bi tekniken bidez, eta beste kasu batzuetan, bi metodoek antzeko joerak dituzte, hau da, kontzentrazioa lagin batetik beste batera igotzen bada, bi teknikekin antzeman daiteke. Gainera, PLS ereduarekin lortzen diren errore erlatiboak, IC bidez lortutako balioak erreferentziatzat hartuta, guztiak % 16,6tik beherakoak dira, eta, bataz beste, % 8,5eko errore erlatiboa ematen dute.

4. Ondorioak

Lan honen lehen ondorioa hipofosfitoa molibdeno urdinaren erreakzioaren bidez eta espektrofotometria UM-Ikuskorra erabiliz determina daitekeela da. Bibliografian hipofosfitoa deteminatzeko aurki daitezken metodoak teknika kromatografiko edo metodo bolumetrikoetan oinarritzen dira. Garatutako metodoak zenbait abantaila ematen ditu metodo hauekiko; balorazioa baino azkarragoa da, eta ioi-kromatografia baino merkeagoa.

Bigarren ondorioa da fosfitoaren presentzian, hipofosfitoaren determinazioa proposatutako metodoa aplikatuz ezin dela modu erraz batean egin eta PLS bezalako erregresio-eredu konplexuak erabili behar dira. Horrela, molibdeno urdinaren erreakzioa erabiltzea lortu da nikel bainuetan hipofosfito-kontzentrazioaren bilakaera kontrolatzeko. Metodo espektrofotometrikoak bi abantaila nagusi eskaintzen ditu balorazio tradizionalarekiko: alde batetik, neurketa egiteko 10 minutu bakarrik behar dira, eta iodometriarekin, aldiz, 30. Bestalde, beharrezkoa den lagin kantitatea murrizten da, 5 mL-tik 5 µL-ra, hau da 1000 aldiz, eta sortzen diren hondakinak 2,6 mL besterik ez dira. Beraz, metodo erabilgarria izan daiteke hipofosfitoaren kontrola egiteko elektroless bainuetan.

5. Etorkizunerako planteatzen den norabidea

Lan honetatik abiatuta egiteko lana dago. Batetik, hipofosfitoaren determinazio bera hobetzea dago, erreakzio baldintzak eta kalibrazio-eredua guztiz optimizatzea. Bestetik, erreakzio bera garatzen saiatzea baina espektrofotometria UM-Ikuskorra erabili ordez, irudi digitalaren analisia erabilita. Halaber, interesgarria izango litzateke fosfitoa kontrolatzeko metodo bat garatzea. Horretarako lehen urratsa lan honetan ikusitako interferentzia modelatzen saiatzea izan litzateke, eta bestela alternatibaren bat bilatzea.

6. Erreferentziak

Albizu, G., Bordagaray, A., Dávila, S., Garcia-Arrona, R., Ostra, M., Vidal, M. (2020), Analytical control of nickel coating baths by digital image analysis, *Microchemical Journal*, 154, 104600.

Anton, A. (1965), Spectrophotometric determination of hypophosphite in the presence of phosphate, *Analytical Chemistry*, 37, 1422-1423.

Hari Krishnan, K., John, S., Srinivasan, K.N., Praveen, J., Ganesan, M., Kavimani, P.M. (2006), An overall aspect of electroless Ni-P depositions - A review article, *Metallurgical and materials transactions A*, 37A, 1917-1926.

Kanani, N. (2004), Electroplating: Basic Principles, Processes and Practice, Elsevier, Alemania.

Mallory, G.O. eta Hajdu, J.B. (1990), Electroless Plating: Fundamentals and Applications, William Andrew, Orlando, FL.

McDowell, M. M., Ivey, M. M., Lee, M. E., Firpo, V. V.V.D., Salmassi, T. M., Khachikian, C. S., Foster, K. L. (2004), Detection of hypophosphite, phosphite, and orthophosphate in natural geothermal water by ion chromatography, *Journal of Chromatography A*, 1039, 105-111.

Nagul, E. A., Mckelvie, I.D., Worsfold, P., Kolev, S.D. (2015), The molybdenum blue reaction for the determination of orthophosphate revisited: Opening the black box, *Analytica Chimica Acta*, 890, 60-82.

Rossman, J., Portala, F., Kirner, G., Steinbach, A. (begiratua: 2021/03/08), Monitoring of nickel sulfate, hypophosphite and alkalinity in electroless nickel plating baths, Methrom..

Scanzillo, A. P. (1954), Spectrophotometric determination of sodium hypophosphite as a molybdenum blue complex, *Analytical Chemistry*, 26, 411-412.

Stankiewicz, A., Szczygieł, S., Szczygieł, B. (2013), Summary of existing models of the Ni-P coating electroless deposition process, *International Journal of Chemical Kinetics*, 45, 755-762.

Sudagar, J., Lian, J., Sha, W. (2013), Electroless nickel, alloy, composite and nano coatings – A critical review, *Journal of Alloys and Compounds*, 571, 183-204.

7. Eskerrak

Lan hau Euskal Herriko Unibertsitateak (PIF 18/282) emandako dirulaguntzei esker eraman da aurrera.

PEF polimeroaren birziklapen zirkularra

Gabirondo, E.[1], Martínez de Ilarduya, A.[2], Sardon, H.[1], Torres-Giner, S.[3]

[1]POLYMAT, University of the Basque Country UPV/EHU, Joxe Mari Korta Center, Avda. Tolosa 72, 20018 Donostia-San Sebastian, Spain

[2]Department d'Enginteria Química, Universitat Politècnica de Catalunya, Barcelona School of Industrial Engineering (ETSEIB), Diagonal 647, Barcelona, 8028 Spain

[3]Novel Materials and Nanotechnology Group, Institute of Agrochemistry and Food Technology (IATA), Spanish National Research Council (CSIC), Calle Catedrático Agustín Escardino Benlloch 7, 46980 Paterna, Valencia, Spain.

elena.gabirondo@ehu.eus

Laburpena

Plastikoaren erabilera eta ondorioz, produkzioa handitzen ari da etengabe munduan, erregai fosilak agortzen ari gara eta hondakin tonak eta tonak sortzen ditugu. Hondakin hauen kantitate handi bat erabilera bakarreko ontzi-arinetatik dator, %40 hain zuzen ere. Azken urteetan polietileno furanoatoa (PEF) polimeroak interes handia erakarri du, ontzi-arinetarako behar diren propietate aproposak erakusten dituelako eta gainera bio-oinarrikoa delako, baina zoritxarrez ez da biodegradagarria. Lan honetan, PEF polimeroaren birziklapen kimikoa aztertzen da, industrialki eraginkorra den prozesu bat erabiliz eta organokatalizatzaile baten presentzian. Birziklapen zirkularraren bidez hasierako PEFaren propietate konparagarriak dituen PEF birziklatu bat lortzen da.

Hitz gakoak: Ekonomia zirkularra, bio-oinarri, PEF, organokatalisia, ontzi-arinak.

Abstract

The use of plastic and as a result, production is constantly increasing in the world, we are running out of fossil fuels and we are generating tons and tons of waste. A large amount of this waste comes from single-use packaging, 40%. In recent years, polyethylene furanoate (PEF) polymer has attracted a great interest due to its appropriate properties for packaging applications. In addition is bio-based, but unfortunately not biodegradable. In this work, the chemical recycling of PEF polymer is studied, using an industrially efficient process and in the presence of an organocatalyst. Circular recycling results in a recycled PEF with comparable properties to the virgin PEF.

Keywords: Chemical recycling, Biobased, PEF, organocatalysis, packaging.

1. Sarrera eta motibazioa

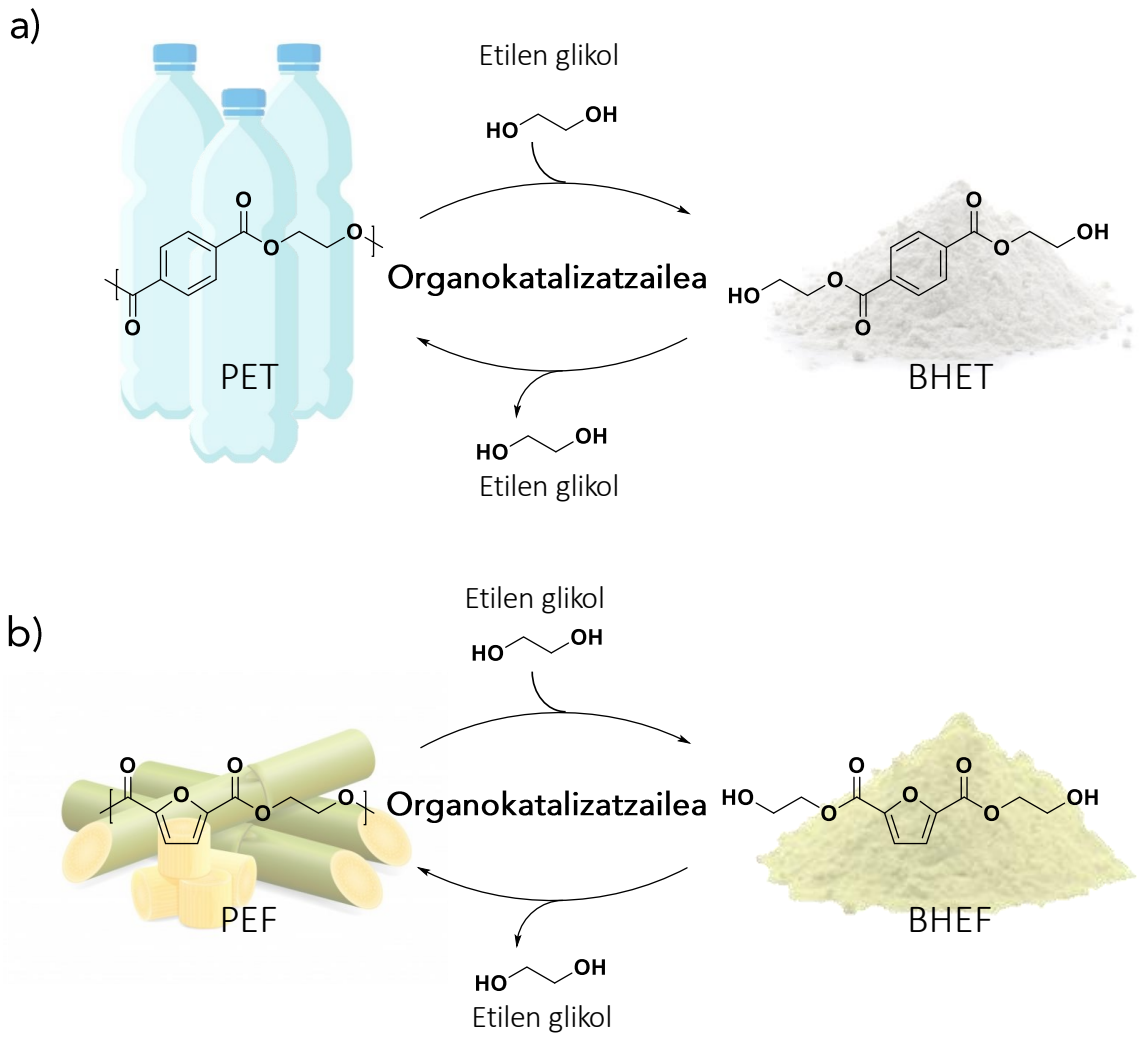
Plastikoaren ekoizpena etengabe handitzen ari da munduan, plastiko horietatik gehienak petroliotik eratorritakoak dira eta ondorioz, erregai fosilen ustiaketa sakona eragiten dute. Gainera, plastiko gehienak birziklatzen ez direnez, hondakin kantitate handiak sortzen dira plastikoaren bizitza erabilgarria amaitzen denean. Arazo horretan gehien eragiten ari den aplikazioetako bat ontzi-arinen ekoizpena da, hauek ekoizten diren plastiko guztiaren % 40 osatzen dute. Ontziratze-aplikazioek propietate mekaniko eta hesi-propietate onak behar dituzte, eta, potentzialki, bio-oinarrikoa eta birziklagarriak izan behar dute[1,2]. Azken urteetan, bio-oinarriko polimero bat, polietileno furanoatoa (PEF), interesa erakartzen ari da dituen propietate mekaniko onengatik, bai eta hesi propietate bikainengatik ere, polietileno tereftalatoa (PET) polimeroarenak baino hobeak. Azken polimero hau da ontzi arinen ekoizpenean gehien erabiltzen den polimeroetako bat. Hala ere, PEF materialaren arazoa ez dela biodegradagarria da eta, beraz, ingurumenean metatuko dela bizitza erabilgarria amaitzean.

Ontziratze-aplikazioetarako erakusten dituen propietateak kontuan izanik, interesgarria izango litzateke birziklapenaren inguruko arazoak konpontzen edo gutxitzen saiatzea. Horiek konponduz gero ontzi arinentzako oso kandidatu egokia izango bailitzateke[3]. Horregatik lan honetan PEF polimeroaren depolimerizazioa proposatzen da DBU:BA katalizatzaile organikoa erabiliz eta monomero

erabilgarritan bihurtuz. Ondoren, monomero horiek baliatuko dira berriz ere PEF polimeroa sintetizatu ahal izateko.

2. Arloko egoera eta ikerketaren helburuak

Lan honetan, beraz, PEF polimeroaren birziklapena aztertu da horretarako industria-garrantzia duen prozesu jasangarri bat aplikatuz eta plastikoaren ekonomia zirkularra kontuan hartuz. PET polimeroarentzako erabiltzen den prozesua aztertu da PEF polimeroarentzat ere baliagarria izan daitekeen ikusteko.



1. irudia. a) PET polimeroarentzat erabiltzen den birziklapen prozesua eta b) PEF polimeroarentzat aztertu nahi dena.

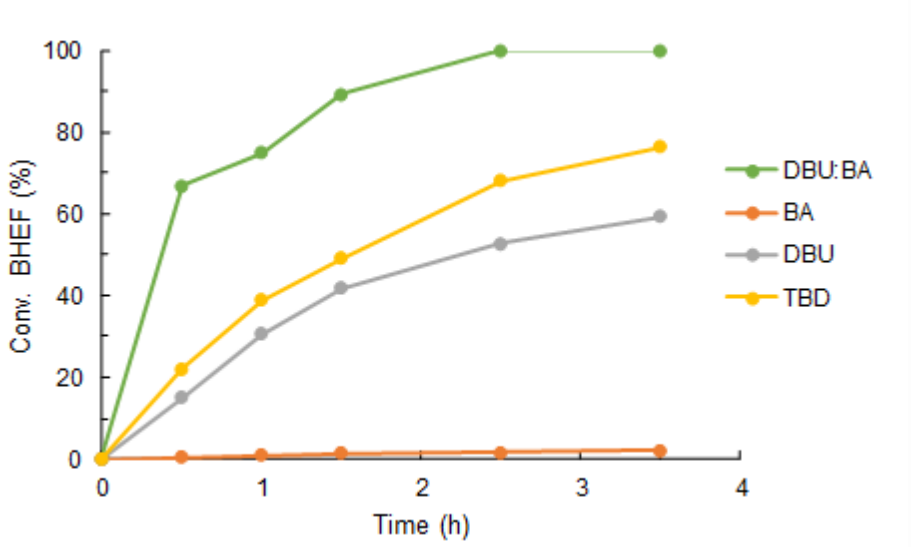
Birziklapena glikolisi bidez egingo da, hau da, etilen glikola erabiliko da eta ester loturak apurtuko dira alkoholetan bukatzen den monomeroak lortuz, bis-2-hidroxietil furanoatoa (BHEF). PET polimeroarentzat ere modu berdinean egiten da eta bis-2-hiroxitil tereftalato (BHET) monomeroa lortzen da, ondoren horren polimerizazioak PET birziklatua lortzea ahalbidetzen duelarik.

Prozesu horretarako katalizatzaile organiko ezberdinak aztertuko dira egokiena zein den ikusteko, katalizatzaile horiek, azido bentzoikoa (BA), 1,5,7-triazabiziklo[4.4.0]dek-5-ene (TBD), 1,8-diazabiziklo[5.4.0]undek-7-eno (DBU) eta 1,8-diazabiziklo[5.4.0]undek-7-eno: azido bentzoiko (DBU:BA) gatza. Erabilitako katalizatzaile guztiak organokatalizatzaileak dira, izan ere, horiek metalikoekin alderatuz onura nabarmenak dituzte, ezabatzeko erraztasuna eta toxikotasun baxuagoa adibidez. Behin PEF polimeroa depolimerizatu, monomeroetan zatitu ondoren, BHEF monomeroa lortu ote den egiaztatu da, monomero hori izango baita berriro ere PEF polimeroa lortzeko aukera emango duena. BHEF monomeroaren presentzia konfirmatzean berriro ere polimeroa egiteko prozesua aztertuko da, horrela birziklapen prozesua guztiz itxiz.

Hala ere, polimero birziklatua lortzean, bere propietateak egokiak ote diren baieztatu behar da, bestela ez baita prozesua erabilgarria suertatuko. Horregatik hasierako polimeroaren eta polimero birziklatuaren propietate termikoak alderatuko dira.

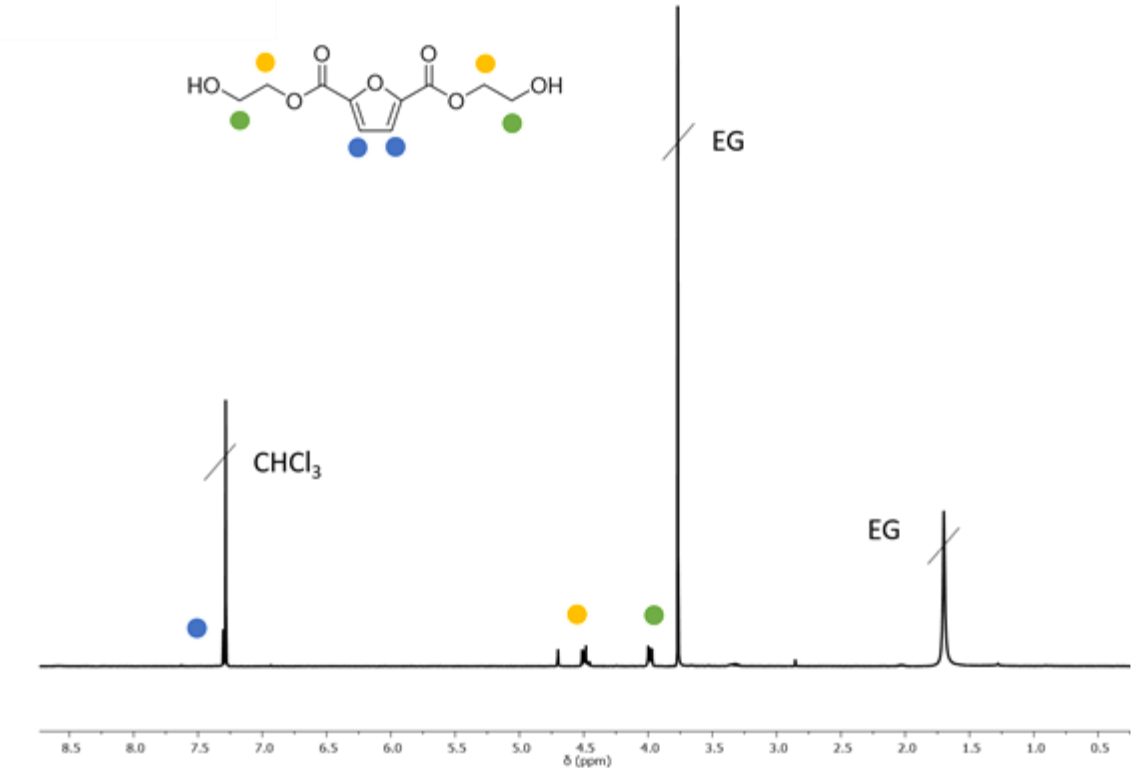
3. Ikerketaren muina

Lehenik, PEF polimeroaren depolimerizazioa, polimeroaren zatiketa, egin da. Horretarako etilen glikola erabili da glikolisia eragiteko katalizatzaile organiko ezberdinen presentzian eta ikusi da DBU:BA dela ondoen funtzionatzen duena. (2. Irudia).

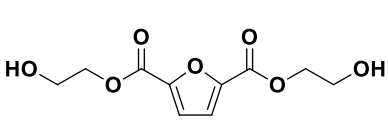


2. irudia. BHEF monomeroaren sintesiaren abiadura katalizatzaile organiko ezberdinak erabiliz.

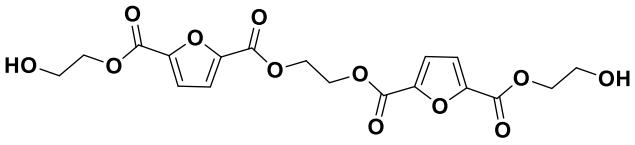
Etilen glikolak polimeroaren ester loturen apurketa eragingo du alkoholetan bukatutako monomeroak emanez. Polimeroaren depolimerizazioaren produktua ^{1}H-NMR eta MALDI-TOF tekniken bidez egiaztatu da BHEFaren sintesia eman dela ziurtatzeko (3. eta 4. irudiak).



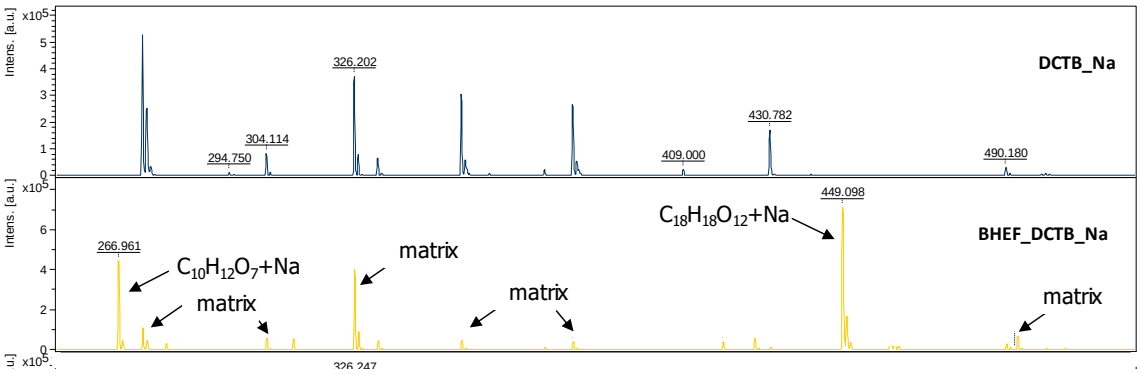
3. irudia. BHEF monomeroaren sintesiaren baieztapena ^{1}H-NMR teknikaren bidez.



Chemical Formula: $C_{10}H_{12}O_7$
Exact Mass: 244,06



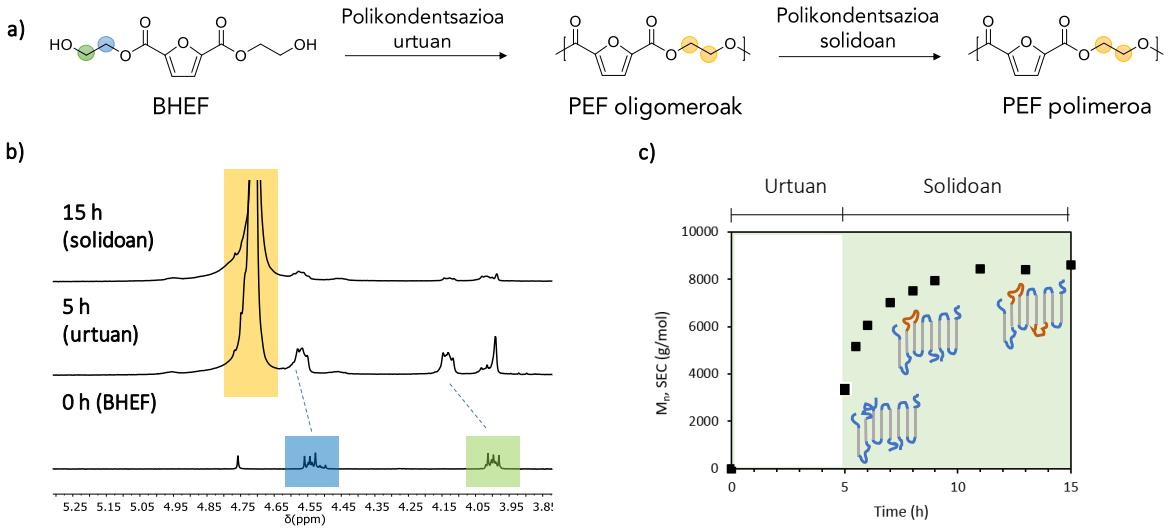
Chemical Formula: $C_{18}H_{18}O_{12}$
Exact Mass: 426,08



4. irudia. BHEF monomeroaren sintesiaren baieztapena MALDI-TOF teknikaren bidez.

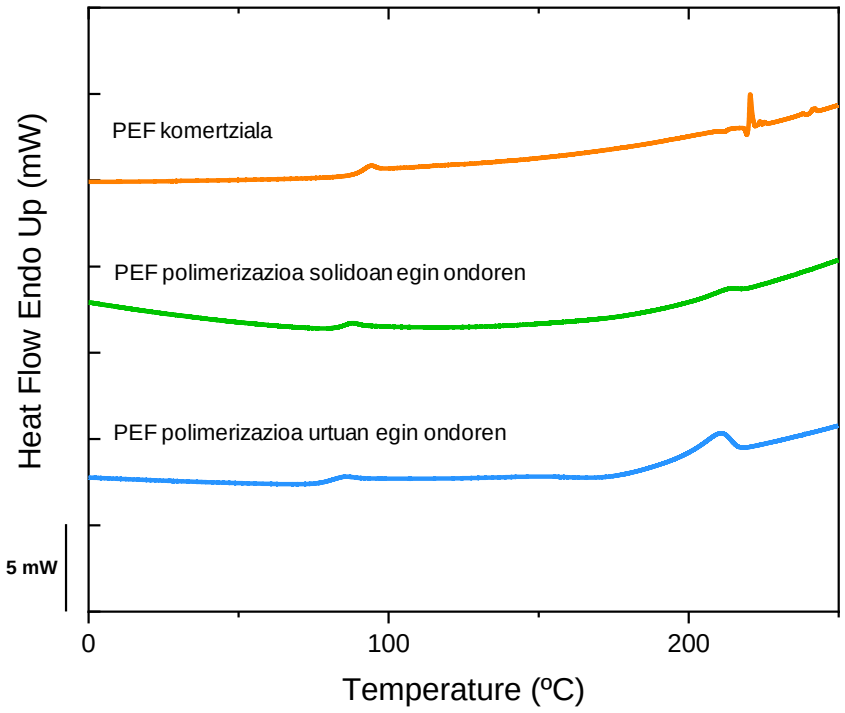
Behin BHEF monomeroa lortzean, polimerizazioa ikertuko da, berriro ere PEF polimeroa lortzeko. Horretarako depolimerizaziorako erabili den katalizatzaile berdina erabiliko da, DBU:BA eta berotuz eta hutsunea eginez polikondentsazio erreakzioa bultzatuko da. Prozesu hau bi etapetan egingo da, lehenik polikondentsazio sinplea eginez, hau da, polikondentsazioa fase urtuan eta ondoren, solido egoerako polikondentsazioa egingo da. Bigarren etapak polimeroaren pisu molekularra handitzeko

aukera ematen du. Sintetizatutako polimero birziklatua ^{1}H-NMR eta GPC tekniken bidez egiaztatu da (5. irudia).



5. irudia. Polimerizazioaren jarraipena ^{1}H-NMR eta GPC tekniken bidez.

Hala ere lortu den polimero birziklatuak eta hasierako polimeroak propietate berdinak dituzten konparatzea oso garrantzitsua da prozesuaren aplikagarritasuna egiaztatzeko orduan. Horretarako, bi polimeroen propietate termikoak konparatu dira (6.irudia).



6. irudia. Polimero birziklatuaren eta polimero komertzialaren konparaketa DSC teknikaren bidez.

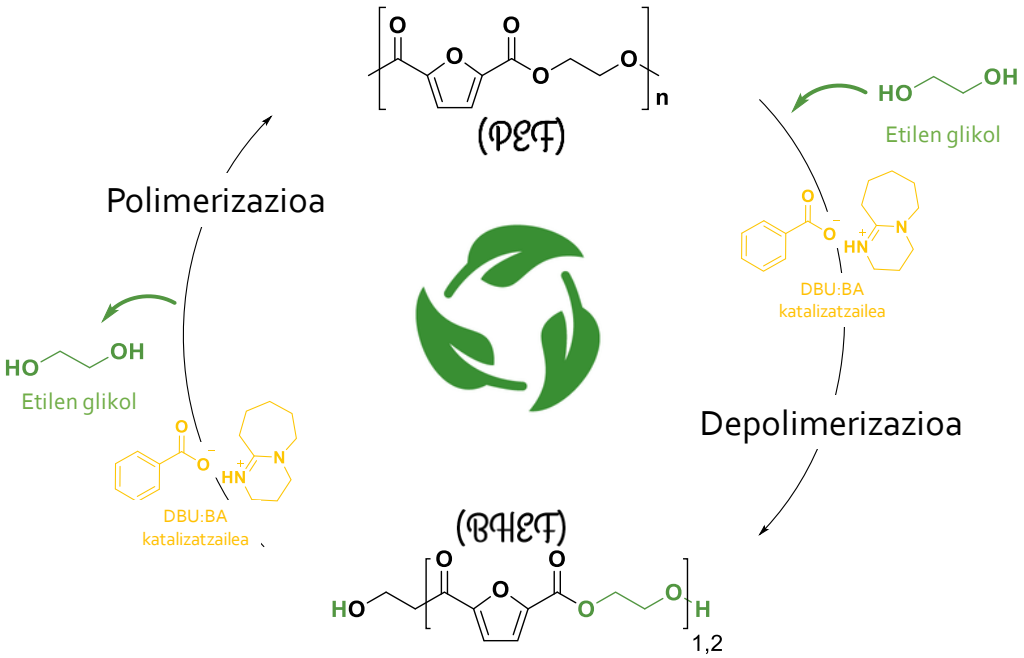
4. Ondorioak

Aurreko zatian aipatutako prozesuak eman dira aurrera, lehenik polimeroaren depolimerizazioa aztertuz eta ondoren polimerizazioa.

Depolimerizazioaren kasurako ikusi da aztertutako katalizatzaileen artean DBU:BA (1,8-diazabiziklo[5.4.0]undek-7-eno: azido bentzoikoa) azido-base gatza izan dela eraginkorrena eta BHEF monomeroaren eraketa ekarri duela 2 orduko epean eta 180 ºC-tan.

Ondoren, DBU:BA katalizatzaile berdina erabiliz polimeroaren sintesia eginda eta horretarako aipatutako bi etapak erabili dira. Fase urtuko polikondentsazioan 220 ºC-tan eta hutsunea erabiliz pisu molekular baxuko PEF polimeroa lortu da. Bigarren etapan 200 ºC-tan egin da nitrogenoaren 10 mL/min-ko emariarekin eta kasu honetan polimeroaren pisu molekularra nabarmen haztea lortu da.

Amaitzeko, hasierako eta bukaerako polimeroen propietate termikoak konparatu dira, horretarako DSC teknika erabili da eta ikusi da bi polimeroek antzeko propietateak erakusten dituztela.



7. irudia: PEF polimeroaren birziklapen prozesuaren eskema.

5. Etorkizunerako planteatzen den norabidea

Etorkizunean prozesu hau industrialki aplikatzeko, prozesu hau eskala handian egin beharko litzateke eta horrek izan beharko luke aztertu beharko litzatekeen hurrengo prozesua. Izan ere, prozesu hau industrialki aplikatzeko berriro ere depolimerizazio eta polimerizazio tenperatura eta denborak ikertu beharko lirateke, izan baitaiteke eskala handitzean prozesuaren eraginkortasuna aldatzea.

6. Erreferentziak

1. PlasticsEurope, "*Plastics – the Facts 2018*" (2018).

2. PlasticsEurope, “The Circular Economy for Plastics - A European Overview” (2019).

3. E. Gabirondo, B.Melendez , C. ARNAL, J. M. Lagaron, A. Martínez de Ilarduya, H. Sardon and S. Torres Giner, (2021) Organocatalyzed Closed-Loop Chemical Recycling of Thermo-Compressed Films of Poly(ethylene furanoate). *Polym.Chem.*, DOI: 10.1039/D0PY01623C

7. Eskerrak eta oharrak

Egileek eskerrak ematen dituzte UPV/EHUko IZO-SGI SGIk eta Europako finantziazioak (ERDF eta ESF) emandako laguntza tekniko eta gizatiarragatik. Autoreek esker onez aitortzen dute Espainiako Zientzia eta Berrikuntzako Ministerioaren (MICI) finantza-laguntza, MAT2017-83373-R proiektu askekoa eta Bartzelonako Pol taldeari emandako SSP erreaktoreagatik.

Grafeno oxidoak bakarrik eta adsorbatutako bentzo(a)pirenoarekin itsas muskuiluetan eragindako kalteak

González-Soto, N., Bilbao, E., Cajaraville, M.P.
ZBIT ikerketa taldea, Zoologia eta Animalia Zelulen Biologia Saila, Zientzia eta Teknologia Fakultatea, Plentziako Itsas estazioa (PIE-UPV/EHU) Euskal Herriko Unibertsitatea (UPV/EHU), Leioa, Euskal Herria.
nagore.gonzalez@ehu.eus

Laburpena

Industria eta teknologiaren garapenak ezaugarri bereziak dituzten material berrien sorrera ekarri du; horien artean, grafenoak eta bere eratorriek interes handia piztu dute. Esponentzialki hazten ari den ekoizpenaren ondorioz, grafenoa eta bere eratorriak itsasora iristen ari dira eta, itsas organismoetan eragin ditzaketen kalteen inguruko kezka zabaldu da. Gainera, grafenoak eta eratorriek, azalera-bolumen erlazio handia eta hidrofobikoak izateagatik arrisku gehigarri bat dute: kutsatzaile organiko iraunkorren garraiatzaileak izan daitezke. Gure ikerketaren xedea, grafeno oxidoak, bakarrik zein kutsatzaile organiko iraunkorrak adsorbatuta dituela, muskuiluetan eragindako kalteak aztertzea izan da.

Hitz gakoak: Nanomaterialak, grafenoa, kutsatzaile organikoak, itsasoa, toxikologia

Abstract

The industrial and technological development has resulted in the generation of new materials with special characteristics. Among such materials, graphene and its derivatives have attracted great interest. Due to the exponential increase in production of graphene and its derivatives, they are reaching the marine environment and so there is a widespread concern about the damage they could cause to marine organisms. In addition, graphene and its derivatives pose an additional risk due to their high surface to volume ratio and hydrophobicity: they can act as carriers of persistent organic pollutants. The aim of our research has been to study the damage caused to mussels by the exposure to graphene oxides, alone or with adsorbed persistent organic pollutants.

Keywords: Nanomaterials, graphene, organic pollutants, marine environment, toxicology

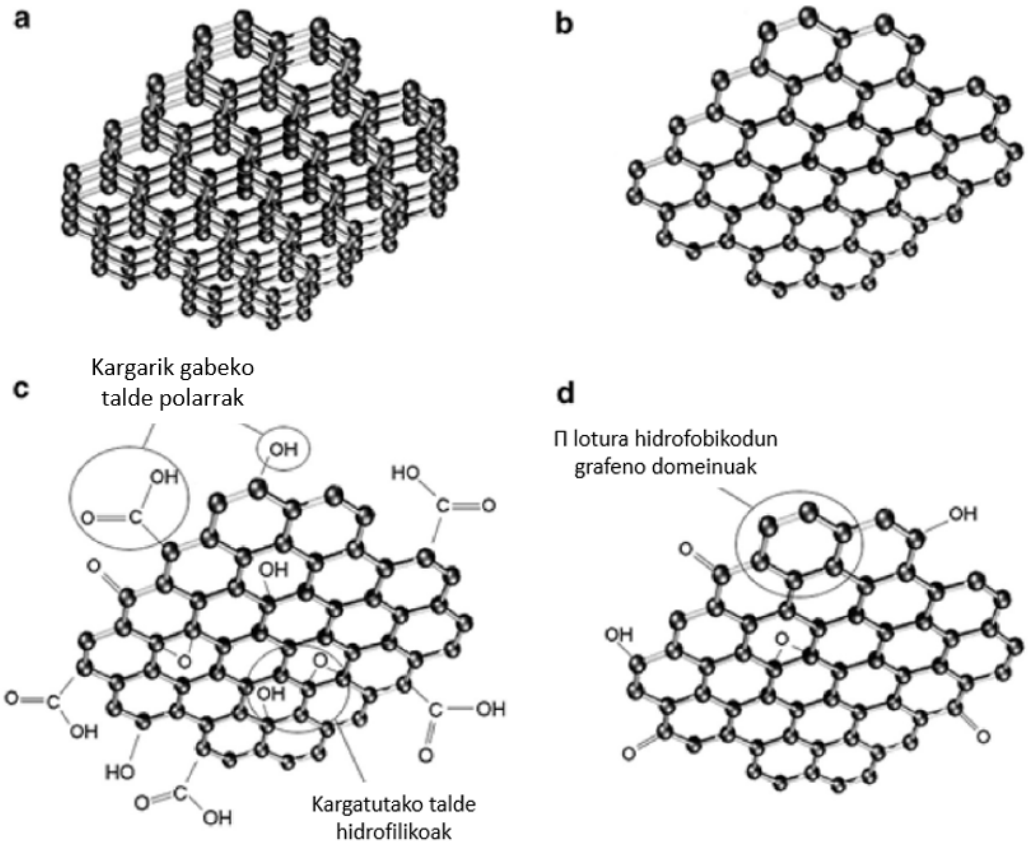
1. Sarrera eta motibazioa

Gizartean etengabe sortzen ari diren beharrizanak asetzeko helburuz, etengabeak dira industria eta teknologiaren aurrerapenak; honela, nanoteknologia bezalako teknologia berriak garatu dira. Nanoteknologiak hazkuntza esponentziala izan du azken hamarkadetan, ikerketa eta robotika mailan lantzetik, egunerokotasunean erabiltzen diren produktu desberdin askoren garapena gauzatzeraino ("The nanodatabase", 2021). Definizioz, nanomaterialak dimentsio bat behintzat, nanoeskalan (<100 nm) duten materialak dira (Nel et al., 2006). Definizio orokor honen baitan, nanomaterialak irizpide ezberdinen arabera sailka daitezke: osagai nagusiaren arabera, nano dimentsio kopuruaren arabera, formaren arabera… Oinarri atomikoa kontuan hartuta, nanomaterialak bi talde handitan banatu daitezke: karbonoan oinarritutako nanomaterialak eta oinarri metalikoa daukaten nanomaterialak (Fadeel eta Garcia-Bennett, 2010).

Azken urteotan, karbonoan oinarritutako nanomaterialek ikertzaileon zein industriaren arreta bereganatu dute (Madannejad et al., 2019), batez ere, grafenoaren aurkikuntzaren ostean (2004). Grafenoa atomo bateko lodiera duen karbonoaren alotropo bat da, non karbono atomoek sp^2

lotura kobalenteen bidez sare kristalinoa eratzen duten. Grafeno xaflen luzera oso aldakorra izan daiteke, nanometro eskasetatik, eskala makroskopikoraino (Novoselov et al., 2004). Egitura honek hainbat ezaugarri bereizgarri ematen dizkio grafenoari, hala nola, ezaugarri termikoak, mekanikoak eta optikoak… grafenoa aplikazio ezberdinetan erabiltzea ahalbidetuz, besteak beste, biomedikuntzan, bateria berrien sorkuntzan edo automobilgintzan (Zhang et al., 2016). Grafenoaren oxigeno, hidrogeno eta karbono atomoen arteko proportzioak aldatuz, grafeno oxidoa eta grafeno oxido erreduzitua lor daitezke grafenotik (1. irudia) (De Marchi et al., 2018). Aldaketa hauek erreaktiboagoak eta biobateragarriagoak egiten dituzte grafeno oxidoa eta grafeno oxido erreduzitua grafenoarekin alderatuta, hurrenez hurren (De Marchi et al., 2018). Nanomaterial hauek material hibridoak eratzeko eta bakterioak hiltzeko erabil daitezke (De Marchi et al., 2018). Horrela, azken urteotan, grafenotik eratorritako nanomaterialen ekoizpena zeharo ari da emendatzen.

1. irudia. Grafenotik eratorritako nanomaterialen adibideak, a) geruza anitzeko grafenoa, b) geruza bakarreko grafenoa, c) grafeno oxidoa, d) grafeno oxido erreduzitua (de Marchi et al., 2018-tik moldatua).



Beste edozein materialekin bezala, grafenoa edo bere eratorriak dauzkaten produktuen ekoizpenak eta erabilpenak nanomaterial hauek ingurumenean sartzea ahalbidetu dezake; besteak beste, ekoizpenean, garraioan zein hondakinen kudeaketan zehar, dela emisio

atmosferikoen bidez zein ur araztegien bidez (De Marchi et al., 2018). Ur inguruneko organismoak grafenoa eta bere eratorriek sortu dezaketen kutsadurarekiko sentikorrak dira; are gehiago material hauen azken geralekuak itsasoa eta ozeanoak izanik. Ondorioz, azken urteotan grafenoa eta bere eratorriek itsas organismoetan eragin ditzaketen kalteen inguruko kezka nabarmenki zabaldu da (Corsi et al., 2014).

2. Arloaren egoera eta ikerketaren helburuak

Gaur egun grafenoa eta bere eratorrien ingurumeneko kontzentrazioa guztiz ezezaguna da. Alde batetik, ez delako garatu nanomaterial hauen ingurumeneko kontzentrazioak neurtzeko behar den teknologiarik eta bestetik, ez delako garatu ingurumeneko kontzentrazioak estimatzeko modelo matematikorik. Ikertzaile batzuk iradoki dutenez, grafenoaren eta bere eratorrien ingurumeneko kontzentrazioak, karbonoan oinarritzen diren beste nanomaterialen tarte berean egotea espero da; antzeko egitura eta pareko aplikazioak dauzkatelako. Horrela, grafenoak eta bere eratorriek ingurune urtarretan duten kontzentrazioa ng/L eta µg/L artean egotea espero da (Sun et al., 2016; De Marchi et al., 2018).

Grafenoa eta bere eratorrien toxizitatea aztertzea helburu duten ikerketa lanetan, zelulen mintzen integritatearen murrizketa eta estres oxidatiboa, genotoxizitatea, hantura zein osasun maila orokorraren murrizketa behatu dira (Madannejard et al., 2019). Bilaketa bibliografikoa ingurune urtarretako organismoetara mugatzen bada, grafenoaren eta bere eratorrien inguruko informazioa oraindik eskasa da. Izan ere, informazio gehiena ur gezatako animalia ereduetan oinarritzen baita; *Danio rerio* zebra arrainean eta *Daphnia magna* krustazeoan, nagusiki (De Marchi et al., 2018). Honek asko zailtzen du itsasoan aurkitu beharreko ingurumen kontzentrazio atalasak ezartzea; izan ere, nanomaterialek portaera ezberdina dute ur gezetan eta ur gazitan eta ondorioz baita toxizitate ezberdina ere. Gainera, maila trofiko ezberdinetan kokatuta dauden organismoetan neurtu den toxizitatea ezberdina izan da, mikroalga, bibalbioak edo/ta poliketoak aztertu direnean (De Marchi et al., 2018; 2019).

Gainera, itsas ingurunean kutsatzaileak ez dira bakarka agertzen, eta beraz, kutsatzaileen toxizitate bateratua ikertzea ezinbestekoa da ekosistemen osasuna eta jasangarritasuna bermatzeko. Batez ere, grafenoa eta grafenotik eratorritako nanomaterialak bezalako konposatu berriak ingurunera sartu daitezkeelako eta dagoeneko bertan dauden kutsatzaileekin elkarrekintzak sortu ditzaketelako. Grafenoa eta grafenotik eratorritako nanomaterialak bakarka aztertzeak, konposatu hauen toxizitate profila gutxiestea ondoriozta lezake. Izan ere, grafenoak eta grafenotik eratorritako nanomaterialek duten azalera-bolumen erlazio handia eta hidrofobizitatea direla eta, ur inguruneetan dauden hainbat konposatu adsorbatu ditzakete, esate baterako, tindatzaileak (Robati et al., 2016), kutsatzaile organikoak (Wang et al., 2014), metal astunak (Wu et al., 2018) eta farmakoak (Nam et al., 2015). Hori dela eta, grafenoa eta bere eratorriak zenbait kutsatzaileren ezabaketarako proposatu dira; horien artean, petrolio isurketenak (Iqbal & Abdala, 2012). Ezabaketa praktika honen eragozpenetako bat grafenoa eta bere eratorriak ingurumenera modu ez kontrolatuan askatzea izango litzateke, era honetan, adsorbatutako kutsatzaileak itsas organismoentzako eskuragarriagoak bilakatuz. Fenomeno honi, hots, grafeno eta bere eratorriek ingurune urtarretan dauden substantzia toxikoak adsorbatu eta adsortzio horrek kutsatzaileak bioeskuragarriago egiteari "Troiako Zaldia" fenomenoa deritzo (Sanchis et al., 2016). Troiako Zaldia fenomeno hori bereiziki kezkagarria da kutsatzaile organiko iraunkorretaz (POP, ingelesetik *persistent organic pollutants*) ari garenean. POPak prozesu kimiko, biologiko eta fotolitikoen bitartez nekez degradatzen diren konposatu organikoak dira (Ritter et al., 2007). Laborategi lanetan frogatu denez, grafenoak eta bere eratorriek POPak adsorbatu ditzakete, ur inguruneko POPen dinamikak aldatuz (Wang et al., 2014; Martinez-Alvarez et al., 2021). POPen artean bentzo(a)pireno hidrokarburo aromatiko poliziklikoa aipagarria da, genotoxikoa, mutagenikoa eta disruptore endokrinoa izateaz gain, estres oxidatiboa eta minbizia sortzeko gai delako eta itsas ingurunean aurki daitekeelako (Water Framework Directive, 2008).

Testuinguru honetan gure ikerketaren xedea izan da, grafeno oxidoak, bakarrik zein bentzo(a)pireno adsorbatuta duela, *Mytilus galloprovincialis* itsas muskuiluen molekula, zelula, ehun zein organismo mailan eragindako kalteak aztertzea.

3. Ikerketaren muina

Mytilus galloprovincialis muskuiluak Mundakan batu ziren 2019ko otsailean, eta esperimentua hasi baino lehen, 21 egunez aklimatatu ziren laborategian. Esperimentuan zehar muskuiluak 7 egunez mantendu ziren baldintza estandarretan (kontrola), grafeno oxidoaren pean (GO tratamendua, 500 µg/L), aurrez bentzo(a)pireno adsorbatua zuen grafeno oxidoaren pean (GO+BaP tratamendua, 500 µg/L GO + 100 µg/L bentzo(a)pireno) eta bentzo(a)pirenoaren pean (BaP tratamendua, 96.7 µg/L; kontzentrazioa, GO+BaP tratamenduaren bentzo(a)pireno adsorbatuaren kontzentrazioari dagokio (Martinez-Alvarez et al., 2021)). Talde esperimental bakoitzeko 2 akuario jarri ziren, bakoitza 57 muskuilurekin.

Grafeno oxidoa Graphenean (Donostia) erosi zen. Xaflen luzera 500 nm eta mikra gutxi batzuen artekoa zen, lodiera 2 nm baino txikiagoa zen eta oxigenozko edukia %40 ingurukoa zen (Martinez-Alvarez et al., 2021). Bentzo(a)pirenoa adsorbaturik zeukan grafeno oxidoa hurrengo eran prestatu zen (Martinez-Alvarez et al., 2021): Grafeno oxidoa eta bentzo(a)pireno disoluzioa (100 µg/L) 500 µg: 10 mL proportzioan nahastu ziren. Nahastea 24 orduz iluntasunean mantendu zen orbital batean irabiatzen. Ondoren, 9000 g-tan 30 minutuz zentrifugatu zen. Jalkina, MilliQ uretan bersuspenditu zen, nahastea muskuiluei bota aurretik.

7 egunen buruan, muskuiluetatik hemolinfa erauzi eta muskuiluak disekzionatu ziren tratamendu ezberdinek eragindako kalteak aztertzeko. Muskuiluen hemozitoetan, katalasa entzima antioxidatzailearen jarduera eta zelulen bideragarritasuna ikertu ziren, zelula mailako biomarkatzaile moduan. Ehun ezberdinetan itu-entzimen jarduera neurtu zen: efektu neurotoxikoen markatzaile gisa muskulu aduktorean Azetilkolinesterasa (AchE); metabolismo aerobikoaren markatzaile gisa, digestio guruineko Isozitrato Deshidrogenasa; digestio guruin eta zakatzetan, bioeraldaketa metabolismoko bigarren faseko Glutation-S-Transferasa (GST); eta Glutation peroxidasa, Superoxido Dismutasa (SOD) eta katalasa entzima antioxidatzaileak . Gainera, digestio guruinaren eta gonadaren azterketa histopatologikoa burutu zen ehun mailako kalteak aztertzeko; eta organismo mailan: sexua, ugalketa zikloaren fasea, indize gonadala eta baldintza-indizea (ingelesezko *condition index*) zehaztu ziren. Akuario bakoitzeko 7-10 muskuilu erabili ziren teknika bakoitzerako.

Bestalde, muskuilu osoak gorde ziren RAMAN espektroskopia eta analisi kimikoen bidez grafeno oxidoa eta bentzo(a)pirenoa ehunetan barneratu eta metatzen diren aztertzeko, hurrenez hurren. Azkenik, muskuiluen gorotzetan grafeno oxidoa aztertu zen RAMAN espektroskopiaren bidez.

3.1. Grafeno oxidoaren barneraketa eta bentzo(a)pirenoaren biometaketa muskuiluetan

RAMAN espektroskopia erabiliz, GO eta GO+BaP tratamenduen pean mantendutako muskuiluetan grafeno oxidoa topatu zen muskuiluen digestio traktuaren argian. Zakatzetan eta gonadan ordea ez. Honek, grafeno oxidoa irentsiz barneratu zela iradokitzen du. Gainera, GO eta GO+BaP tratamenduen pean mantendutako muskuiluen gorotzetan grafeno oxidoa topatu zen, barneratutako grafeno oxidoaren proportzio bat digestio prozesuan zehar kanporatzen dela ondorioztatuz.

Analisi kimikoek GO+BaP eta BaP tratamenduen pean mantendutako muskuiluen ehunetan bentzo(a)pirenoa metatu zela erakutsi zuten, grafeno oxidoa, adsorbatzen dituen konposatuen itsas uretango garraiatzailea izan daitekeela baieztatuz. Hala ere, GO+BaP tratamenduaren pean mantendutako muskuiluek BaP tratamenduaren pean mantendutako muskuiluek baino bentzo(a)pireno gutxiago metatu zuten, seguruena, grafeno oxidoaren proportzio bat gorotzekin

batera kanporatu izanagatik. Horrela, bentzo(a)pirenoa desadsorbatzeko beharrezko denbora, grafeno oxidoak muskuiluen barnean pasatako denbora baino luzeagoa izango litzateke.

3.2. Hemozitoen bideragarritasuna eta jarduera entzimatikoak

Zelula mailan, GO+BaP eta BaP tratamenduen pean mantendutako muskuiluen hemozitoen bideragarritasuna murriztu egin zen, baina tratamendu ezberdinen katalasa entzimaren jarduera antzekoa izan zen.

Ehun mailan, muskulu aduktore, digestio guruin edo zakatzetan neurturiko entzimen jarduera ez zen aldatu grafeno oxidoaren eraginaren pean. GO+BaP eta BaP tratamenduen pean mantendutako muskuiluetan ordea, AchE entzimaren eta bioeraldaketaren II. faseko GST entzimaren jarduera inhibitu ziren muskulu aduktorean eta digestio guruinean, hurrenez hurren. Era berean, BaP tratamenduaren pean mantendutako muskuiluen kasuan SOD entzima antioxidatzailearen jardueraren inhibizioa eman zen digestio guruinean eta GO+BaP tratamenduaren pean mantendutako muskuiluetan berriz, katalasaren indukzioa.

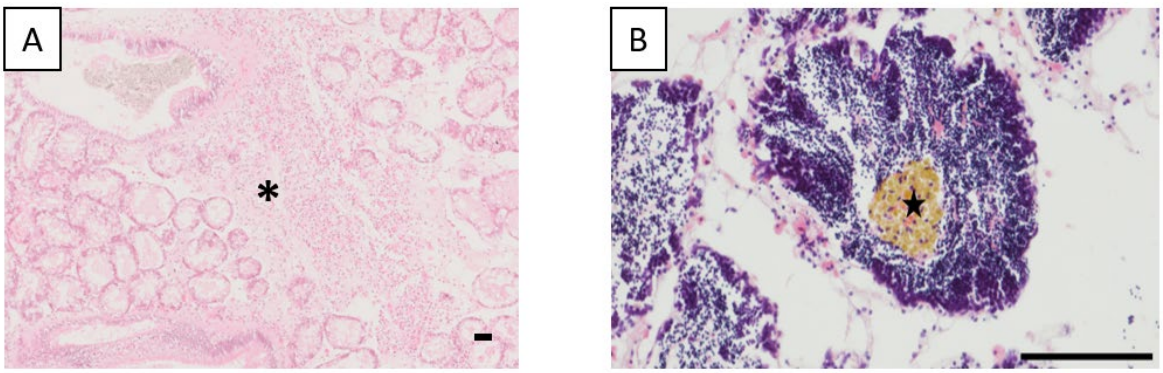
Hortaz, emaitzok osotasunean aztertuta, bentzo(a)pirenoa da aztertutako entzimen jardueretan aldaketa gehien eragin dituen kutsatzailea, GO eta GO+BaP tratamenduekin alderatuta. Gainera, grafeno oxidoari adsorbatutako bentzo(a)pirenoak kalte gehigarriak eragin ditu muskuiluen osasunean grafeno oxidoarekin alderatuta, “Troiako Zaldia” fenomenoaren adierazlea izan daitekeena.

3.3 Digestio guruinaren eta gonadaren azterketa histopatologikoa eta organismo mailako erantzunak

Muskuiluen ehunetako azterketa histopatologikoan, grafeno oxidoak hantura motako erantzuna eragin dezakeela ikusi zen, zelula arreen metaketak nabarmenak izanik.

Digestio guruinaren ehun konektiboan zelula arreen metaketa behatu zen GO, GO+BaP eta BaP tratamenduen pean mantendutako muskuiluetan. GO tratamenduaren pean egondako muskuiluetan gainera, infiltrazio hemozitikoak ageri ziren (2.A. irudia). GO eta GO+BaP tratamenduaren pean mantendutako muskuiluetan, zelula arreen metaketak digestio traktuaren epitelioan ere ageri ziren. Orohar, GO+BaP tratamenduaren pean mantendutako muskuiluen zelula arreen metaketa GO tratamenduaren pean egondako muskuiluena baino handiagoa zen.

2. a) GO tratamenduaren pean mantendutako muskuilu baten digestio guruinaren ebaki histologikoa, hematoxilina & eosinarekin (H&E) tindatuta, infiltrazio hemozitikoa duena. b) BaP tratamenduaren pean mantendutako muskuilu ar baten gonadaren ebaki histologikoa, H&Erekin tindatuta, folikulu gonadalaren barnean zelula arreen metaketa duena. Eskala: 100 µm.



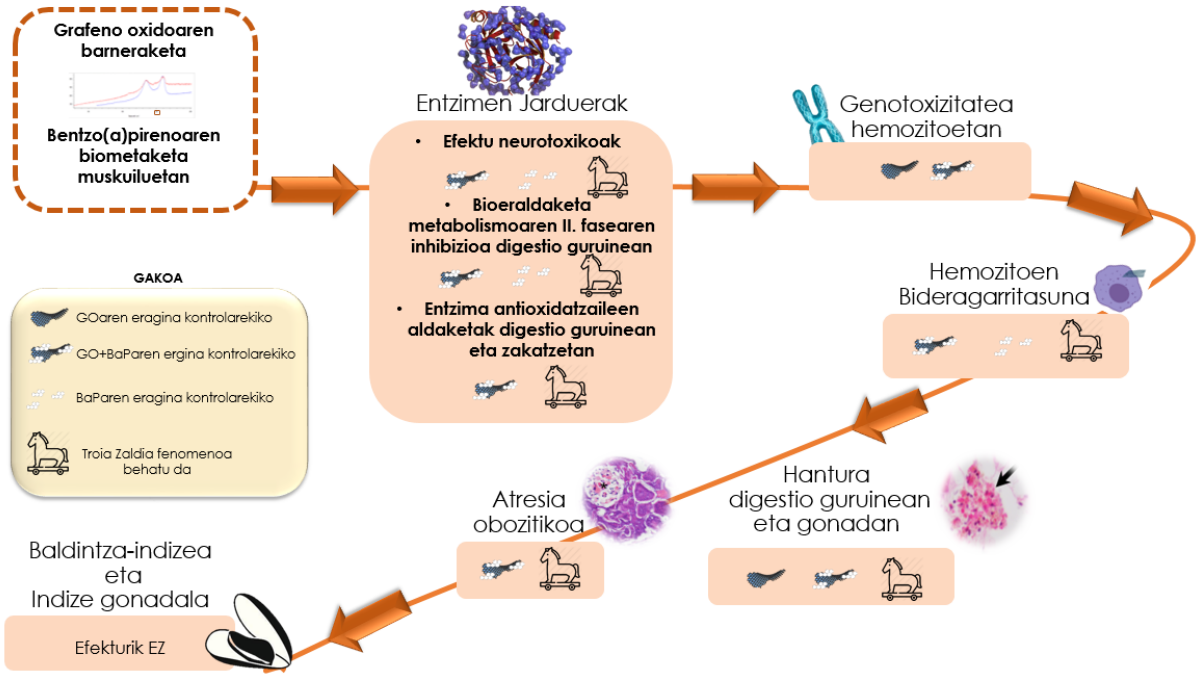
Gonadan, zelula arreen metaketak GO eta BaP tratamenduen pean egondako muskuiluetan behatu ziren soilik (2.B. irudia); fibrosia, berriz, GO tratamenduaren pean egondako muskuiluetan bakarrik. GO+BaP eta BaP tratamenduen pean egondako muskuiluek infiltrazio hemozitikoak erakutsi zituzten gonadaren ehun konektiboan.

GO, GO+BaP eta BaP tratamenduen pean egondako muskuiluek 2 eta 3 graduko atresia obozitikoa erakutsi zuten, GO+BaP tratamenduaren pean egondako muskuiluetan bereiziki handia zena. Honek, grafeno oxidoari adsorbatutako bentzo(a)pirenoak muskuiluen osasunean kalte gehigarriak sor ditzakela adierazten du. Bestalde, ez zen desberdintasunik aurkitu muskuiluen sexuen arteko proportzioa, ugalketa zikloaren fasea, indize gonadala edo/eta baldintza-indizea aztertzean.

4. Ondorioak

Laburbilduz, grafeno oxidoak eta bentzo(a)pireno adsorbatua duen grafeno oxidoak efektu kaltegarriak eragin ditzakete itsas muskuiluen osasunean (3. irudia). Gainera, grafeno oxidoak bentzo(a)pirenoa moduko POPak garraia ditzake adsorbatuta eta ondorioz, eragin ditzakeen zelula eta ehun mailako efektuak areagotu daitezke. Azkenik, nanomaterialek itsas ingurunean duten eragina aztertzeko orduan, “Troiako Zaldia” delako fenomenoa kontuan hartu beharrekoa dela ondorioztatzen da.

3. GO, GO+BaP eta BaP tratamenduen pean mantendutako muskuiluetan behatutako efektuak laburbiltzen dituen eskema.



5. Etorkizunerako planteatzen den norabidea

Lan asko dago egiteke itsasoan eman daitezken balizko kutsadura egoerak simulatzeko, bereziki kutsatzaileen kontzentrazio errealak erabiliz. Esperimentu ugari burutu beharko da oraindik tamaina, mota eta forma ezberdineko nanomaterialekin eta izaera anitzeko

kutsatzaileekin, benetako arriskua ezagutu nahi baldin bada. Gainera, konbinaketa horiek hainbat itsas organismoetan izan ditzaketen eraginak frogatzear daude.

Ikerketa hau abiapuntutzat hartuta, grafenotik eratorritako nanomaterialek bakarka zein adsorbatutako kutsatzaileak dituztenek, itsas muskuiluetan zein beraien gameto eta enbrioietan epe luzera izan ditzaketen eraginak argitzea izango da gure lan taldearen hurrengo erronka.

6. Erreferentziak

Corsi, I., Cherr, G.N., Lenihan, H.S., Labille, J., Hassellov, M., Canesi, L., Dondero, F., Frenzilli, G., Hristozov, D., Puntes, V., Della Torre, C., Pinsino, A., Libralato, G., Marcomini, A., Sabbioni, E., Matranga, V. (2014). Common strategies and technologies for the ecosafety assessment and design of nanomaterials entering the marine environment. *ACS Nano* 8, 9694-9709.

De Marchi, L., Coppola, F., Soares, A.M.V.M., Pretti, C., Monserrat, J.M., de la Torre, C., Freitas, R. (2019). Engineered nanomaterials: From their properties and applications, to their toxicity towards marine bivalves in a changing environment. *Environmental Research* 178, 108683.

De Marchi, L., Pretti, C., Gabriel, B., Marques, P.A.A.P., Freitas, R., Neto, V. (2018). An overview of graphene materials: Properties, applications and toxicity on aquatic environments. *Science of the Total Environment* 631–632, 1440–1456

Fadeel, B., Garcia-Bennett, A.E. (2010). Better safe than sorry: understanding the toxicological properties of inorganic nanoparticles manufactured for biomedical applications. *Advanced Drug Delivery Reviews* 62, 362–374.

Iqbal M.Z., Abdala A.A. (2012). Oil spill cleanup using graphene. *Environmental Science and Pollution Research* 20, 3271–3279.

Madannejad, R., Shoaie, N., Jahanpeyma, F., Darvishi, M.H., Azimzadeh, M., Javadi, H. (2019). Toxicity of carbon-based nanomaterials: Reviewing recent reports in medical and biological systems. *Chemico-biological Interactions* 307, 206–222.

Martinez-Alvarez, I., Le Menach, K., Devier, M.H., Barbarin, I., Tomovska, R., Cajaraville, M.P., Budzinski, H., Orbea A. (2021). Uptake and effects of graphene oxide nanomaterials alone and in combination with polycyclic aromatic hydrocarbons in zebrafish. *Science of The Total Environment* 775, 145669.

Nam, S.W., Jung, C., Li, H., Yu, M., Flora, J.R.V., Boateng, L.K., Her, N., Zoh, K.D., Yoon, Y. (2015). Adsorption characteristics of diclofenac and sulfamethoxazole to graphene oxide in aqueous solution. *Chemosphere* 136, 20–26.

Nel, A., Xia, T., Madler, L., Li, N. (2006). Toxic potential of materials at the nanolevel. *Science* 311, 622–627.

Novoselov, K. S., Fal, V. I., Colombo, L., Gellert, P. R., Schwab, M. G., Kim, K. (2012). A roadmap for graphene. *Nature* 490, 192-200.

Ritter, L., Solomon, Kr., Forget, J., Stemeroff, M., O'leary, C. (2007). "Persistent organic pollutants". *United Nations Environment Programme*.

Robati, D., Mirza, B., Rajabi, M., Moradi, O., Tyagi, I., Agarwal, S., Gupta, V.K. (2016). Removal of hazardous dyes-BR 12 and methyl orange using graphene oxide as an adsorbent from aqueous phase. *Chemical Engineering Journal 284*, 687–697.

Sanchís, J., Olmos, M., Vincent, P., Farré, M., Barceló, D. (2016). New insights on the influence of organic co-contaminants on the aquatic toxicology of carbon nanomaterials. *Environmental Science & Technology* 50, 961-969.

Sun, T.Y., Bornhöft, N.A., Hungerbühler, K., Nowack, B. (2016). Dynamic probabilistic modeling of environmental emissions of engineered nanomaterials. *Environmental Science & Technology* 50, 4701–4711.

The nanodatabase: http://nanodb.dk/en/search-database/ Retrieved 2021-03-10

Water Framework Directive, 2008. Environmental Quality Standards Directive (EQSD). 105/EC. http://ec.europa.eu/environment/water/water-framework/priority_ substances.htm. 2021-03-10

Wang, J., Chen, Z., Chen, B. (2014). Adsorption of polycyclic aromatic hydrocarbons by graphene and graphene oxide nanosheets. *Environmental Science & Technology* 48, 4817–4825.

Wu, L.K., Wu, H., Zhang, H.-B., Cao, H.-Z., Hou, G.Y., Tang, Y.P., Zheng, G.Q. (2018). Graphene oxide/CuFe2O4 foam as an efficient absorbent for arsenic removal from water. *Chemical Engineering Journal* 334, 1808–1819.

Zhang, J., Terrones, M., Park, C. R., Mukherjee, R., Monthioux, M., Koratkar, N., Kim, Y. S., Hurt, R., Frackowiak, E., Enoki, T., Chen, Y., Chen Y., Bianco, A. (2016). Carbon science in 2016: Status, challenges and perspectives. *Carbon* 98, 708-732.

7. Eskerrak eta oharrak

- Ikerketa hau, Espainiako Gobernuko MINECOk (CTM2016-81130-R, NACE) eta Eusko Jaurlaritzak (N. Gonzalez-Sotoren doktoretza aurreko beka eta IT810-13 eta IT1302-19 ikerketa talde finkatuaren bitartez) finantzatu dute.
- Egileok Nagore Blasco, Mireia Irazola eta Radmila Tomovska ikertzaileak eskertu nahi ditugu beraien partehartzeagatik; bereziki, analisi histopatologikoetan, RAMAN espektroskopian eta grafeno oxido horniduran emandako laguntzagatik, hurrenez hurren.