V. IKERGAZTE

NAZIOARTEKO IKERKETA EUSKARAZ

Kongresuko artikulu-bilduma

ZIENTZIAK ETA NATURA ZIENTZIAK

2023ko maiatzaren 17, 18 eta 19
DONOSTIA, EUSKAL HERRIA

ueu

(c) 2023 Udako Euskal Unibertsitatea (UEU)
Euskal Herriko Unibertsitatea (UPV/EHU), Deustuko Unibertsitatea (UD), Nafarroako Unibertsitate Publikoa (NUP), Mondragon Unibertsitatea (MU), Nafarroako Unibertsitatea (UNAV), Paueko eta Aturrialdeko Unibertsitatea (UPPA), Urrutiko Hezkuntzarako Unibertsitate Nazionala (UNED), Eusko Jaurlaritza, Udalbiltza, Gipuzkoako Foru Aldundia eta Donostiako Udala laguntzaileak izan dira edizio honetan.
(c) Egileak

Editoreak:
Olatz Arbelaitz Gallego, Ainhoa Latatu Nuñez, Elixabete Perez-Gaztelu

Artikuluak *Creative Commons* Aitortu-PartekatuBerdin 3.0 lizentziapean daude

ISBNa: 978-84-8438-862-3 Lan osorako
ISBNa: 978-84-8438-867-8 5. liburukia
DOI: https://dx.doi.org/10.26876/ikergazte.2023.05

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

Handitzen handitzen: Ferra-saguzarren garapena eta dietaren aldaketa, *Miren Aldasoro Lezea, Joxerra Aihartza Azurtza, Lander Olasagasti Hosteins* eta *Nerea Vallejo Lopez*....15

Mintzeko-kolesterola: bakterio-toxinen aspaldiko laguna, *Jone Amuategi Aulestiarte, Rocio Alonso Estrada* eta *Helena Ostolaza Etxabe*....21

Fotobabesleen eraginkortasuna aztertzen laser espektroskopiaren bidez, *Iker Lamas Frejo, Raúl Montero Santos, Maider Parra Santamaria, Ander Camiruaga Leza, Imanol Usabiaga Gutierrez* eta *Asier Longarte Aldama*....29

Geoffroy saguzarraren dieta Euskal Herrian, *Nerea Vallejo López, Joxerra Aihartza Azurtza, Lander Olasagasti Hosteins, Miren Aldasoro Lezea, Urtzi Goiti Ugarte* eta *Inazio Garin Atorrasagasti*....37

Nanopartikulen sintesian zeharreko tamainaren neurketa denbora errealean, *Usue Olatz Aspiazu Iturbe, Jose Ramon Leiza Rekondo* eta *Maria Paulis Lumbreras*....45

Kakatokien eraginkortasuna ur-satorra (*Galemys pyrenaicus*, Talpidae) detektatzeko eta haren banaketaren patroiak deskribatzeko, *Jon Levy Otheguy, Jorge González Esteban, Arturo Elosegi Irurtia* eta *Joxerra Aihartza Azurtza*....53

Bitamina hidrosolubleak Euskal Herriko Mendiko Zaldia arrazako behorren esnean: Karakterizazioa eta edoskitzaroaren zeharreko eboluzioa, *Ana Blanco Doval, Maria Ángeles Bustamante Gallego, Luis Javier Rodriguez Barron* eta *Noelia Aldai Elkoro-Iribe*....59

Polimeroak sortzeko behar diren molekulen sintesia neurrira egindako biokatalizatzaileak erabiliz, *Ainhoa Maiz Iginitz, Elena Gabirondo Amenabar, Daniel Andres Sanz, Fernando Lopez Gallego* eta *Haritz Sardon Muguruza*....67

Kimika dinamikoa 3D argi ultramore bidezko fotopolimerizazioan aplikatua, *Jon Ayestaran Uriarte, Robert Aguirresarobe Hernandez, Itxaso Calafel Martinez* eta *Haritz Sardon Muguruza*....73

Botikaz betetako hidrogelen 3D inprimaketa: erreologia-inprimatze baldintzen harremana, *Itziar Insua Castellanos, Oliver Wolfgang Etzold, Marcelo Calderón* eta *Robert Aguirresarobe*....81

Gehigarri polimerikoen sintesia eta hauek zementuaren hidratazioan daukaten eraginaren azterketa, *Aitor Barquero Salaberria, Sara Beldarrain Pavo, Alejandro Herranz Berzosa, Edurne Erkizia Jauregi, Jorge Sanchez Dolado* eta *Jose Ramon Leiza Rekondo*.....89

Nafarroako Aratxea izendapenean gizendutako animalien ongizatea: Elikadura konbentzionala vs Azpiproduktu begetalak, *Aroa Romero, Pablo González, Sara León Ecay, Irantzu Goenaga Rodriguez, José Antonio Mendizabal* eta *Kizkitza Insausti*.....97

X Izpien Mikrofluoreszentzia tresna gisa mikroplastikoetan dauden sugar-atzeratzaileen migrazioa monitorizatzeko: akrilonitrilo butadieno estireno eta deka-209-aren kasua, *Egoitz Fraga Lopez, Ainara Gredilla Altonaga, Olivia Gomez-Laserna* eta *Alberto de Diego Rodriguez*.....105

Mikroplastikoen karakterizazio kimikoa eta morfologikoa: Sopelako Atxabiril hondartzako kasua, *Aritz Lapazaran Bidezabal, Uxue Uribe Martinez, Thomas Maupas, Olivia Gomez Laserna, Leire Mijangos Treviño* eta *Alberto de Diego Rodríguez*.....113

Konposatu per- eta polifluoratuen esposizioa haurtzaroan. Osasun publikoko estrategia esposomiko bat ikertzen, *Anne San Román Martínez, Eunate Abilleira Cillero, Amaia Irizar Loibide, Belen Gonzalez Gaya* eta *Nestor Etxebarria Loizate*.....121

Neurofibroma-MPNST progresioaren ikerkuntza induzituriko zelula ama pluripotenteen (iPSC) ereduan oinarritutako sistema erabiliz, *Itziar Uriarte Arrazola, Helena Mazuelas Gallego, Juana Fernández Rodríguez, Miriam Magallón Lorenz, Sara Ortega Bertran, Conxi Lázaro Garcia, Bernat Gel Moreno, Meritxell Carrió* eta *Eduard Serra*.....129

Leishmaniasia: gaixotasun globala. Tratamendurako hautagai berriak, *Itziar De Miguel Romero, Aroia Burguete Mikeo, Rima El Dirany, José Peña Guerrero, Celia Fernández Rubio* eta *Paul Nguewa*.....137

Petrolio eta bio iturrietatik eratorritako monomeroen konparaketa estaldura jasangarrien garapenerako, *Sara Rubio Murillo, Aitor Barquero Salaberria, Edurne González Gandara* eta *Jose Ramon Leiza Rekondo*.....145

Onddo mikorriziko arbuskularrak: nekazaritza ereduaren eta Arabako babarrun barietateen eragina, *Irati Ijurco-González, Estibaliz Sarrionandia Areitio, Arantza del Canto* eta *Maite Lacuesta Calvo*.....153

Zenbateraino eragiten diote bakterio-komunitateek esne gordineko gazten kalitateari eta kaltegabetasunari?: Idiazabal gaztaren kasua, *Gorka Santamarina García, Gustavo Amores Olazaguirre* eta *Mailo Virto Lekuona*.....161

Silizezko nanopartikulen egituraren analisia espektroskopia infragorriaren bidez, *Mireia Sainz-Menchón, Iñigo González de Arrieta Martinez* eta *Gabriel Alejandro López*.....169

Kannabinoideak eta polimeroak: hamaika aukera kapsula terapeutikoen garapenean, *Aitor Villate Uribe, Gaston Pablo Barreto, Markel San Nicolas Oruetxebarria, Maitane Olivares Zabalandikoetxea, Oier Aizpurua-Olaizola* eta *Aresatz Usobiaga Epelde*.....177

Antibiotikoen kutsadura ingurunean: transferentzia elikadura-katean zehar, *Irantzu Vergara Luis, Juan Carlos Báez Millán, Olatz Zuloaga Zubieta, Maitane Olivares Zabalandikoetxea* eta *Ailette Prieto Sobrino* 185

Nano-zuntz berri eta erabilgarrien fabrikazioa *electrospinning* jasangarriaren bidez, *Mario Martinez Yubero* eta *Edurne González*.....193

Epoxi ur-dispertsioak estaldura antikorrosiboetan, *Alvaro del Castillo Corral, Edurne González Gandara* eta *Maria Paulis Lumbreras*.....201

Tetrafluoroetileno sulfonatuan oinarritutako ionomero komertzialen saretzea protoi-trukatzaileko erregai-pilen mintzen eroankortasuna hobetzeko, *Alba Gonda Lazkano, Justine Elgoyhen, Amaia Agirre Etxebarria* eta *Radmila Tomovska*.....209

Kolesterol-kanporaketaren estimulazioa ateroma ereduan, rHDLen administrazio sekuentzialarekin, *Shifa Jebari Benslaiman, Kepa Belloso Uribe, Asier Benito Vicente, Unai Galicia García, Asier Larrea Sebal, Ane San José Urteaga, Iraide Alloza Moral, Koen Vanderbroeck* eta *Cesar Martín Plagaro*.....217

Ardiaren 21 ehunetan karakterizatutako eta kuantifikatutako miRNA molekulen adierazpenaren banaketaren azterketa, *Martin Bilbao Arribas, Aitor Guisasola Serrano, Endika Varela Martínez, Laura Diez Fuentes* eta *Begoña Marina Jugo*.....225

Bio oinarrituak diren dioletatik lortutako poliol berrien esplorazioa eta sintesia, *Ane Olazaba, Andere Basterretxea Gorostiza, Haritz Sardon Muguruza* eta *Coralie Jehanno*.....233

1 motako diabetesarekin asoziaturiko RNA ez kodetzaile batek mikropeptido bat ekoiztu dezake, *Jon Mentxaka Salgado, Koldo García Etxebarria, Henar Rojas Marquez, Ane Olazagoitia Garmendia, Leire Bergara, Luis Manuel Mendoza Gomez, Ainara Castellanos Rubio* eta *Izortze Santin Gomez*.....239

Nanoegiturazko biomaterial magnetikoen aplikazioa ehun-ingeniaritzan, *Izaro Solozabal Azcarate, Raquel Zurbano Tejada, Maria Dolores Boyano Lopez, Beatriz Arteta Ruiz, Aitor Benedicto Garcia, Carolina Redondo Esteban* eta *Rafael Morales Arboleya*.....247

Tse5, bakterioen arteko lehian arrakastarako giltza, *Jon Altuna Alvarez, Amaia González Magaña* eta *David Albesa Jové*.....255

Hiri-lurzoruetako metalen eta metaloideen bioeskuragarritasunaren ebaluazioa, *Ainhoa Lekuona Orkaizagirre, Ainara Gredilla Altonaga, Maite Meaurio Arrate, Eneko Madrazo Uribeetxebarria* eta *Maddi Garmendia Antin* 263

Ingurumen-kutsaduraren isla jaioberrien lehen elikagaian: substantzia arrotzen analisia ama-esnean, *Inés Baciero Hernandez, Maider Ayerra, Mikel Musatadi Larrucea, Maitane Olivares Zabalandikoetxea, Ailette Prieto Sobrino* eta *Olatz Zuloaga Zubieta*.....271

Alteromonas spp. generoko itsas andui baten mekanismo molekular eta zelularrak karbono polimerikoaren degradazioaren parte hartzean, *Uxue Arrizabalaga Luzuriaga, Carla Pérez Cruz, Raquel Liébana Garcia, Eli Bilbao Garcia* eta *Laura Alonso Sáez*.....279

Nola ezagutu dezakegu gure esposoma?, *Mikel Musatadi Larrucea, Claudia Caballero, Asier Andrés Maguregi, Paula Bustamante, Eider Gerekaetxebarria, Jon Zumalabe, Maitane Olivares Zabalandikoetxea* eta *Olatz Zuloaga Zubieta*.....285

Axioi Inflazioa, *Daniel G. Figueroa, Joanes Lizarraga Olano, Ander Urio Garmendia* eta *Jon Urrestilla Urizabal*.....293

Mikroplastikoen analisia sedimentuetan: Prozedura baten proposamena, balidazioa eta aplikazioa, *Uxue Uribe Martínez, Thomas Maupas, Olivia Gomez Laserna, Leire Kortazar Oliver, Luis Ángel Fernández Cuadrado, Leire Mijangos Treviño* eta *Alberto de Diego Rodríguez*.....301

Mendiko larreetako polinizatzaileen bazka-portaera aldaketak denbora eta espazioan, *Maddi Artamendi Arzamendi, Ainhoa Magrach*, *Arantza Aldezabal Roteta* eta *Paula Domínguez Lapido* 309

Euskal estuarioetako sedimentuetako mikroorganismo harizpidunen aniztasuna: Genomen analisia ikuspuntu bioteknologikotik, *Ainara Otamendi Elizalde, Ziortza Agirrezabala Urkia, Carla Pérez Cruz, Raquel Liébana Garcia, Iñaki Berregi Abalde, Anders Lanzén, Laura Alonso Sáez, Maria Teresa Dueñas Chasco* eta *Oier Etxebeste Juarez*.....317

Hegaztien dibertsitatea Bizkaiko baso natural eta landaketa exotikoetan, *Unai Sertutxa Irazola, Lorena Peña Lopez, Ibone Ametzaga Arregi* eta *Unai Ortega Lasuen*.....325

Aljeriako behien nodulu linfatikoetatik isolatutako *Pseudochrobactrum algeriensis* espezie berriaren deskribapena eta *Pseudochrobactrum* generoa identifikatzeko tresna molekularraren garapena, *Maite Loperena Barber, Mammar Khames, Chantal Renau Mínguez, Amaia Zúñiga Ripa, Mireia Coscollá Devis, Mustapha Oumona, Ignacio Moriyón Uria* eta *Raquel Conde Álvarez*.....333

Ekosistema zerbitzuen ebaluazioa lurraldea-antolamenduan integratzen Urdaibaiko Biosfera Erreserban, *Unai Ortega Lasuen, Ibone Ametzaga Arregi, Unai Sertutxa Irazola* eta *Lorena Peña Lopez*.....341

Kolesterol zunda bioortogonal baten bidezko nanoeskala mailako lipido hetereogeneotasunaren behaketa zeluletan, *June Olazar Intxausti, Maier Lorizate Nogales, Oihana Terrones Uria, Jon Ander Nieto Garai* eta *F.-Xabier Contreras Gomez*.....349

Partikulen azeleragailuetan mikrofoniak kontrolatzeari buruzko oinarrizko kontzeptuak: MADRC algoritmoa, *Ander Elejaga Estiballes*, *Josu Jugo Garcia* eta *Pablo Echevarría Fernandez*.....355

Hil bizirauteko: *Pseudomonas aeruginosaren* Tse5 toxinak, poroak sortzen ditu zelula etsaien mintzetan, *Amaia Gonzalez Magaña, Jon Altuna Alvarez, Carmen Velázquez Ávarez, María Queralt Martín, Antonio Alcaraz González* eta *David Albesa Jové* 363

Cantor entropia altuko aleazioaren emisibitate infragorriaren eta egoera mikroestrukturalaren azterketa, *Mikel Ballarena Tellechea, Jon Gabirondo López, Iñaki López Ferreño, Telmo Echániz Ariceta, Raquel Fuente Dacal, Boris Straumal* eta *Gabriel Alejandro López*.....371

Dislipidemiaren aurkako tratamentu berriak nanopartikulak erabiliz, *Ane San José Urteaga, Asier Larrea Sebal, Shifa Jebari Benslaiman, Asier Benito Vicente, Kepa B. Uribe, Unai Galicia Garcia* eta *Cesar Martín Plagaro*.....377

Kutsatutako eraikuntza-materialen lixibiazioz eratorritako kutsatzaileen eraginaren ebaluazioa ondoko lurzoruetan, *Iñaki Vazquez de la Fuente, Nagore Prieto Taboada, Ainara Gradilla Altonaga, Gorka Arana Momoitio* eta *Juan Manuel Madariaga Mota*.....385

Marearteak eta urte-sasoiak oskol-dimentsioen eta oskol-dentsitatearen moldapena dakar *Mytilus galloprovincialis* muskuiluan, *Maitane Pérez Cebrecos, Xabier Berrojalbiz, Denis Benito Fernandez, Urtzi Izagirre Aramaiona* eta *Irrintzi Ibarrola Bellido*.....393

Nobel Saridun Klik erreakzioaren baliagarritasuna konposatu biologikoak eransteko polimero gainazalean, *Julia Sánchez Bodón, Ane Garcia, Maria Diaz Galbarriatu, Ana Catarina Lopes, Isabel Moreno Benítez* eta *Jose Luis Vilas Vilela*.....401

Izorratu gabe ikertzea: PIT Tagen erabilera Euskal Herriko saguzar kabernikoletan, *Lander Olasagasti Hosteins, Miren Aldasoro Lezea, Nerea Vallejo Lopez, Urtzi Goiti Ugarte, Joxerra Aihartza Azurtza* eta *Inazio Garin Atorrasagasti*.....409

IKERGAZTE 2023
Nazioarteko Ikerketa Euskaraz
HITZAURREA

UEUk 50 urte bete berri dituen honetan euskal komunitate zientifiko-intelektuala trinkotzea du oraindik bere helburu garrantzitsuenetako bat. Horren erakuslea da, azken urteotan UEUren jardunaren ikurra izan den #ElkarEkin lelo eta traola. Elkar ezagutzea eta elkarlana ezinbestekoa da ezagutzak aurrera egin dezan, elkarrengandik ikasiz eta elkarrekin eraikiz.

Ildo horretatik, UEUk hainbat arlotako aditu, aritu eta ikertzaileak biltzen ditu ezagutza-arlo desberdinen inguruan antolatutako zenbait topaketa eta mintegitan: Informatikari Euskaldunen Bilkurak (12 edizio), Historialari Euskaldunen Topaketak (6 edizio), Hizkuntzalari Euskaldunen Topaketak (5 edizio), Matematikari Euskaldunen Bilkura (5 edizio), Osasun Zientzietako ikertzaileen 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, 2019an Baionan eta 2021ean Gasteizen. Aurten Donostian beteko du bosgarren edizioa, Kursaal Jauregian, maiatzaren 17, 18 eta 19an. IkerGazteren bosgarren ediziora inoiz baino artikulu gehiago aurkeztu dira, horrek erakusten du kongresu honen beharra eta eraikitzen ari den erreferentzialtasuna.

“IkerGazte2023: Nazioarteko Ikerketa Euskaraz” goiburu duen kongresuaren artikulu-bilduma dugu hau. Izenburuan *ikerketa*, *euskara* eta *gaztetasuna* bildu nahi izan ditugu. Ikusgarri egin nahi dugu Euskal Herriko ikertzaile gazteek egiten duten nazioarteko mailako ikerketa. Maiz nazioartean erakutsi eta aurkezten dira lan horiek, Euskal Herrian eta euskaraz aurkezteko aukera izan gabe. Kongresu honen helburua da komunitate zientifiko euskalduneko ikertzaileak bildu eta elkarren berri izatea, 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 eramateko ezinbestekoa da bai norbanakoen lan eskerga, baita erakunde publiko eta pribatu ugariren laguntza ere: UEUko lantaldetik hasita, UEUkideak, IkerGazteren Batzorde Zientifikoko ikertzaileak eta Batzorde Dinamizatzaileko ikertzaile gazteak, baita babesleak, laguntzaileak (unibertsitateak, ikerketa-taldeak zein aldizkari zientifikoak) eta komunikabideak ere. Horiez gain, aurten Gipuzkoako Foru Aldundiaren laguntza izan dugu kongresuaren antolaketan, eta, bestalde, Donostiako Udalak eta Udalbiltzak sariak babestu dituzte. IkerGazte kongresuko 5. edizio honetan Eusko Jaurlaritzaren Hezkuntza, Hizkuntza Politika eta Kultura Saila izan dugu laguntzaile, kongresu eta bilera zientifikoak antolatzeko dirulaguntzaren bitartez. Horrez gain, IkerGazteren ibilbidean hainbat pertsonak erakutsitako atxikimendua ere aipatu nahi dugu. Esker mila, guztiei.

Bosgarren edizioa du aurtengoan IkerGaztek, eta aurreko edizioa osasun-krisi betean antolatu ondoren, nolabaiteko normaltasuna berreskuratzeko asmoz ekin diogu kongresuaren antolaketari.

Presentzialtasunak, elkargune formal eta informalak, saio paraleloek eta posterren guneak ohiko formatura itzuli garela erakusten digute, baina aurreko ediziotik ikasitakoa gogoan. Diziplinartekotasuna edo jakintza-arloen mugak gainditzeko asmoz ikertzaileentzat saio plenario ugari eta era askotakoak antolatu ditugu: mikroaurkezpenak, hitzaldi-saioak edo taldetan aritzeko dinamikak.

Aurretik esan bezala, inoiz baino komunikazio gehiago jaso ditugu, 172. Ebaluazio-prozeduraren ondoren, aurreko edizioko kopuruetatik oso gertu gelditu da onartutako komunikazio-kopurua, 155 komunikaziorekin. Prozesu osoa amaituta, ordea, IkerGazte kongresuan, 52 lan ahoz eta 99 poster moduan aurkeztuko dira.

Jakintza-arloei dagokienez hauek dira zenbakiak:

Giza Zientziak eta Artea	16
Gizarte Zientziak eta Zuzenbidea	32
Ingeniaritza eta Arkitektura	29
Osasun Zientziak	22
Zientzia Zehatzak eta Natur Zientziak	52

Diziplinena ez ezik, unibertsitate eta ikerguneen topalekua ere bada IkerGazte eta bateko eta besteko ekarriak biltzen dituzte aurkezten ari garen lanok. Ikertzaileen filiazioari dagokionez, aurreko edizioetakoari eusten dio. Bost liburu hauetako gehienak Euskal Herriko Unibertsitatekoak (UPV/EHU) dira, 116 ekarpen (% 74,8). Mondragon Unibertsitateko ikertzaileek 8 ekarpen egin dituzte, aurreko edizioan baino 3 gutxiago. Deustuko Unibertsitateak 5 lan aurkeztu ditu; aurreko edizioan baino 4 lan gehiago. Nafarroako Unibertsitateak 4 komunikazio eta Nafarroako Unibertsitate Publikoak 3 lan aurkeztu ditu. CNRS-IKER zentroaren ekarpen bakarra jasoko da.

Honako unibertsitate hauetatik ere ekarpenak jaso dira: Universidad Complutense de Madridetik 3 ekarpen, eta Universitat Politècnica de Catalunyatik (UPC) eta Darmstadt University of Applied Sciencesetik komunikazio bana.

Ekarpen askotan unibertsitateei atxikitako ikerketa-zentroak eta taldeak aipatzen dira; besteak beste, Plentziako Itsas Estazioa (PIE), NU-Cima, NU-Tecnun, BioDonostia, BioAraba eta BioCruces Osasun Ikerketa Institutuak, BCMaterials, Polymat, CSIC, MU-Ikerlan, Achucarro Basque Center for Neuroscience edo CIC-energyGUNE. Beste ikerketa-zentro hauek ere parte hartu dute edizio honetan: Aranzadi Zientzi Elkartea, AZTI zentro zientifiko eta teknologikoa, BC3 ikerketa-zentroa, CEIT zentro teknologikoa, Institut de Recerca Germans Trias i Pujol, ICIQ – Institut Català d'Investigació Química eta Osasunbidea, beste batzuen artean.

Bost edizio betetzera goaz 2023ko edizio honetan, eta badugu oraindik ere zertan eragin. Bi urtean behin errepikatzeari eutsiko diogu. Beraz, adi, Ikergazte2025 etorriko da-eta!

Olatz Arbelaitz Gallego, Ainhoa Latatu Nuñez eta Elixabete Perez-Gaztelu

BATZORDEAK, LAGUNTZAILEAK ETA HIZLARIAK

Batzorde Zientifikoa

Batzordeburuak:	Olatz Arbelaitz (UPV/EHU, UEU)
	Elixabete Perez-Gaztelu (Deustuko Unibertsitatea)
Koordinatzailea:	Ainhoa Latatu (UEU)
Idazkaria:	Ane Garetxana (UEU)

Giza Zientziak eta Artea

- Itziar Aduriz (Bartzelonako Unibertsitatea, UEU)
- Agustin Arrieta (UPV/EHU)
- Haizea Barcenilla (UPV/EHU)
- K. Josu Bijuesca (Deustuko Unibertsitatea)
- 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)
- Elixabete Perez Gaztelu (Deustuko Unibertsitatea)
- Blanca Urgell (UPV/EHU)

Gizarte Zientziak eta Zuzenbidea

- Luzia Alberro (Deustuko Unibertsitatea, UEU)
- Josu Amezaga (UPV/EHU, UEU)
- Amaia Arroyo (MU, UEU)
- Aitor Bengoetxea (UPV/EHU, UEU)
- Eneko Bidegain (MU, UEU)
- Lore Erriondo (UPV/EHU, UEU)
- Javier Esteban (UPV/EHU)
- Rakel Gamito (UPV/EHU, UEU)
- Elixabete Imaz (UPV/EHU)
- Mikel Iruskieta (UPV/EHU, UEU)
- Xabier Landabidea (Deustuko Unibertsitatea, UEU)
- Libe Mimenza (UPV/EHU, UEU)
- Bea Narbaiza (UPV/EHU)
- Ixusko Ordeñana (UPV/EHU)
- Josune Saenz (Deustuko Unibertsitatea)
- Eguzki Urteaga (UPV/EHU)

Zientzia Zehatzak eta Natura Zientziak

- Noelia Aldai (UPV/EHU)
- Arantza Aldezabal (UPV/EHU, UEU)
- Estibaliz Apiñaniz (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)
- Ainhoa Latatu (GOI, UEU)
- Josu Lopez Gazpio (GOI, UEU)
- Ane Sarasola (UPV/EHU)
- Jone Uria Albizuri (BCAM)

Ingeniaritza eta Arkitektura
- Olatz Arbelaitz (UPV/EHU, UEU)
- Gorka Azkune (UPV/EHU)
- Ander Goikoetxea (MU)
- Enkarni Gomez (UPV/EHU)
- Mari Luz Guenaga (Deustuko Unibertsitatea)
- Miren Larrion (UPV/EHU, UEU)
- Diego Lopez de Ipiña (Deustuko Unibertsitatea)
- Iñigo Martinez de Alegria (UPV/EHU)
- 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)
- 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
- Mila Amurrio (UPV/EHU, UEU)
- Eneritz Anakabe (UPV/EHU, UEU)
- Iñaki Antiguedad (UPV/EHU, UEU)
- Sonia Arrasate (UPV/EHU, UEU)
- Ainhoa Azurmendi (UPV/EHU)
- Ibon Cancio (UPV/EHU, UEU)
- Joserra Diez (UPV/EHU, UEU)
- Maia Duguine (CNRS-IKER, UEU)
- Mari Luz Esteban (UPV/EHU, UEU)
- Enekoitz Etxezarreta (UPV/EHU, UEU)
- Koldo Garcia (Biodonostia OII, UEU)
- Karlos Ibarguren Olalde (Osakidetza, UEU)
- Amaia Irazusta (UPV/EHU)
- Ander Iturriotz (UPV/EHU, UEU)
- Maider Iturrondobeitia (UPV/EHU)

- Amaia Irazusta (UPV/EHU)
- Maider Iturrondobeitia (UPV/EHU)
- Xabier Lopez (UPV/EHU)
- Eduardo Ogando (UPV/EHU)
- Maitane Olivares (UPV/EHU)
- Monika Ortueta (UPV/EHU)
- Maria Paulis (UPV/EHU)
- Iratxe Retolaza (UEU)
- Oihane Sanz (UPV/EHU)
- Maialen Sistiaga (UEU)
- Itziar Villafañez (UPV/EHU)
- Iker Villanueva (Deustuko Unibertsitatea, UEU)
- Ane Zabaleta (UPV/EHU, UEU)
- Beñat Zaldibar (UPV/EHU)
- Idoia Zarrazquin (UPV/EHU)
- LuisMari Zulaika (UPV/EHU)

Batzorde Dinamizatzailea

- Begoña Altuna (UPV/EHU, UEU)
- Maitane Basasoro (UPV/EHU, UEU)
- Aitor Cevidanes (Neiker, UEU)
- Jon Egaña (UPV/EHU)
- Unai Lertxundi (Nafarroako Unibertsitatea)

Batzorde Teknikoa

- Ander Altuna (hizkuntza-zuzentzailea)
- Emilio Delgado (IKT arduraduna)
- Ane Garetxana (koordinazio teknikoa)
- Idoia Torregarai (komunikazio-arduraduna)
- Ane Sarasua (UEUko idazkari nagusia)

Ikerketa-talde laguntzaileak

- Aholab Signal Processing Laboratory ikerketa-taldea: HiTZ Zentroa: UPV/EHUko ahotsaren tratamendu automatikoaren inguruko ikerketa-taldea.
- Antropologia Feminista Ikerketa Taldea (AFIT-UPV/EHU).
- Catalysis and sustainable polymers ikerketa-taldea (Polymat-UPV/EHU).
- ELEBILAB. UPV/EHUren Elebitasunaren Laborategia.
- FisioKlima-AgroSosT ikerketa-taldea (UPV-EHU).
- Gaixotasun immuneen genetika funtzionala Ikerketa Taldea @FunImmune: UPV/EHUko ikerketa-taldea.
- 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 da (UMR).
- Ikerketa eta Berrikuntza Analitikoa (IBeA). (Zientzia eta Teknologia Fakultatea UPV/EHU).
- IXA Ikerketa Taldea: HiTZ Zentroa: UPV/EHUko hizkuntzaren tratamendu automatikoaren inguruko ikerketa-taldea.
- Jokabide-Ekologia eta Eboluzioa Saguzarretan Ikerketa Taldea. UPV/EHU.
- KoLaborategia Ikerketa Taldea: HUHEZI-MUko Gizarte Digitalerako Hezkuntza eta Komunikazioaren Laborategia.

- Lactiker Ikerketa Taldea : UPV/EHUko ikerketa-taldea.
- Materialen ezaugarri termofisikoen ikerketa-taldea: UPV/EHUko ikerketa-taldea.
- Minbiziaren Biologia Molekularra Ikerketa Taldea (MOLBIOL-CANCER): UPV/EHUko 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.

Aldizkari zientifiko laguntzaileak

- BAT. Soziolinguistikan eta glotopolitikan espezializatutako aldizkaria.
- EKAIA. Euskal Herriko Unibertsitateko zientzia- eta teknologia-aldizkaria da.
- ELHUYAR ZIENTZIA ETA TEKNOLOGIA aldizkaria.
- JAKIN. Giza eta gizarte zientzien alorreko kultur aldizkaria.
- OSAGAIZ. Osasun-zientzien aldizkaria
- TANTAK. Euskal Herriko Unibertsitateko Hezkuntza eta Pedagogiaren arloko aldizkaria.
- UZTARO. UEUk kudeatzen duen giza eta gizarte-zientziei buruzko aldizkaria.

Hizlari gonbidatuak

- Maia Duguine. Hizkuntzalaritzan doktorea, CNRSko ikertzailea da Baionako IKER laborategian. Ikertzailea izan zen Cambridgeko Unibertsitatean, baita irakaslea UPV/EHUko Hizkuntzalaritza eta Euskal Ikasketak Sailean. UEUkidea ere bada.
- Mari Luz Esteban. UPV/EHUko irakaslea eta ikertzailea izateaz gain, Ikasketa Feministak eta Generokoak Doktorego Programa eta AFIT-Antropologia Feminista Ikerketa Taldea koordinatzen ditu. UEUkidea ere bada.
- Unai Pascual. Ekonomia Ekologikoan doktorea, Ikerbasqueko ikertzailea da Klima Aldaketari buruzko Euskal Zentroan (BC3), eta Bernako Unibertsitateko (Suitza) Garapen eta Ingurumen Saileko kidea da.
- Sophie Scott. CBE University College London-eko Neurozientzia Kognitiboko zuzendaria da.

Hitzaldi-saioak eta hizlariak

- CLARIAH-EUS: Ikertzeko molde berrien azpiegitura.
  Hizlariak: Nayla Escribano (Ixa Taldea, HiTZ Zentroa, UPV/EHU), Xabier Sarasola (Orai NLP Teknologiak) eta Begoña Altuna (Ixa Taldea, HiTZ Zentroa, UPV/EHU eta UEU).
- “Argitaratutako ikerketa baten arabera”: makulu-hitzen garaiko komeriak.
  Hizlaria: Uxune Martinez (Euskanpus Fundazioa eta UEU).
- Ikertzaileen osasun mentala: gakoak eta konponbideak.
  Hizlariak: Beñat Garaio (freelance ikertzailea (Biziherri IGB) eta Koldo Mitxelena sariduna) eta Eider Saragueta (UPV/EHUko ikertzaile eta irakaslea).
- IkerGazte kongresuaren produkzioa.
  Hizlariak: Marije Bidaguren (UEU), Aitzol Astigarraga (UEU-GOI) eta David Lindemann (UPV/EHU eta UEU).

Handitzen handitzen: Ferra-saguzarren garapena eta dietaren aldaketa

Miren Aldasoro, Joxerra Aihartza, Lander Olasagasti, Nerea Vallejo
Jokamoldearen Ekologia eta Eboluzioa Ikertaldea, Zoologia eta Animali Zelulen Biologia Saila, UPV/EHU

miren.aldasoro@ehu.eus

Laburpena

Ugaztunek jaiotzetik aldaketa fisiologikoak pairatzen dituztenez, bizi-faseetan zehar dieta aldatzen doa. Lan honetan Euskal Herriko hiru ferra-saguzarren garapenak dietan duen eragina aztertu da, hiru helbururi erantzunez: (1) Espezie bakoitzaren garapen ereduak aztertzea; (2) espezie bakoitzaren dieta adinarekin nola aldatzen den aztertzea; eta (3) hiru espezieen gazteen dietak alderatzea. Espezie bakoitzaren garapen prozesua ezberdina dela, eta gazte eta helduen dietek patroi ezberdinak erakusten dituztela ikusi dugu. Espezializazio handia duten arren, gazteen arteko dietak helduenak baino antzekoagoak dira. Beraz, espezie batzuetan ikasketak dieta baldintzatzen duen bitartean, besteetan berezko ezaugarri fisikoak nahikoak dira espezializaziorako.

Hitz gakoak: saguzarrak, ferra-saguzarrak, dieta, garapena

Abstract

Mammals undergo physiological changes from birth, and their diet varies at different stages of life. This work aims at studying the influence of the development on the diet composition of three horseshoe bats in the Basque Country. Three were the objectives: (1) studying the patterns of development of each species; (2) studying the diet changes along the development of each species; and (3) comparing the diets of the juveniles of the three species. Results show that each species has a different physical development, and they follow diverse dietary patterns. Despite their high specialization, juveniles' diets are more similar. Therefore, while learning constrains diet in some species, specialization precedes foraging in others.

Keywords: bats, rhinolophids, diet, development

1. Sarrera eta motibazioa

Animaliek heltzen doazen heinean aldaketa fisiologikoak pairatzeak bizi-fase ezberdinetan dieta ezberdinak izatea eragiten du (Polis, 1984; Werner & Gilliam, 1984). Gorputzaren tamaina, esaterako, aldagai garrantzitsua da harrapakinak aukeratzerako orduan; beraz, animalia hazi ahala dieta aldatzea arrunta da (Jackson et al., 2004). Bestalde, ugaztun harraparietan –zeinek harrapakina aurkitu, jazarri, harrapatu eta kontsumitu behar duten– esperientziak ere dietaren aukeraketan garrantzia handia du (Bell et al., 2020). Ugaztunen dietaren garapenari buruzko azterlanak, neurri handi batean, ugaztun itsastar (Vales et al., 2015) eta lurtarretan (Bell et al., 2020) zentratu dira. Aldiz, saguzarretan, ugaztun hegalari bakarrak izanik, garapenarekiko dieten aldaketa oso gutxi aztertu da. Kasu honetan, gainera, gorputzaren tamaina eta esperientziaz gain, hegakerak eta ekokokapenaren garapenak ere berebiziko garrantzia izango dute.

Ekokokapenak paper erabakigarria du saguzarren ehiza-jokabidean, ehiza-habitata eta harrapakinen detektagarritasuna baldintzatzen baititu. Eremu zabaletan abiadura azkarrean mugitzen den saguzarrak distantzia handietara detektatu behar ditu harrapakinak, eta horretarako, frekuentzia baxuko soinuak igortzen ditu (urrunago iristen direnak). Aldiz, landarediaren artean harrapakinak detektatu behar dituen saguzarrak frekuentzia altuagoko soinuak erabiltzen ditu (Dietz eta Kiefer, 2016). Horrez gain, espezie handiagoek harrapakin handiagoak ehizatzen dituzte, frekuentzia baxuak erabiliz, eta animalia txikiek frekuentzia altuagoko soinuak igortzen dituzte harrapakin txikiagoak detektatzeko. Saguzarren garapenak ultrasoinuen igorpena ere baldintzatzen du: animalia helduarora hurbildu ahala, ekokokapen-pultsuen frekuentzia igoz doa (Gould, 1971). Ferra-saguzarrek (*Rhinolophus* Lacepede, 1799) frekuentzia konstanteko ekokokapen-pultsuak igortzen dituzte, hau da, soinuaren frekuentzia konstante mantentzen dute

pultsuan zehar (Jones, 1990). Horretarako, baina, ikaskuntza-prozesu sakona behar da, bokalizazioaren garapenarekin batera doana (Emde & Menne 1989).

Saguzar gazteak hegan hasten direnean, oraindik aldi batean edoskitzen jarraitzen dute. Ikasketa eta hobekuntza garaia izan ohi da, titia uzten duten arte. Saguzar gazteek beren orientazioa eta hegaldia hobetu, harrapakinak harrapatzen ikasi (Kunz, 1974; Buchler, 1980) eta elikadura-guneen kokapena ikasi behar dute (Bradbury, 1977). Horri esker, bazka-denbora eta eraginkortasuna garapen eta adinarekin batera handitzen dira (Duvergé, 1996).

Bazkatze optimoaren eredua dieta-aldaketak iragartzeko tresna baliagarria da (Pyke et al., 1977). Teoria honetan oinarrituta, eskuratutako energia gastatutakoa baino handiagoa bada, ehiza ahalegina onuragarria da. Baina zer espero dezakegu ekokokapena erabat garatu ez duten eta hegan ikasten ari diren gazteengandik? Zailtasun horiek errentagarritasun gutxiagoko baina ehizatzen eta maneiatzen errazagoak diren harrapakinak ehizatzea eragin dezakete. Hori dela eta, saguzar gazte guztiek ziurrenik harrapakin txikiak eta mantsoak ehizatuko dituzte, eta geroz eta harrapakin konplexuagoak ehizatuko dituzte trebatu ahala.

2. Arloko egoera eta ikerketaren helburuak

Rhinolophus euryale espeziearen kasuan, saguzar helduek sits handi eta azkarrak jaten dituztela ikusi da; saguzar gazteek, aldiz, sits mantsoago, txikiago eta arinagoak kontsumitzen dituzte. Honek, *R. euryale* gazteek nolabaiteko trebetasun eta/edo psikomotrizitate ikasketa prozesuak paira ditzakeela iradokitzen du (Arrizabalaga-Escudero et al., 2019).

Ikerketa honetan tamaina eta soinu-frekuentzia ezberdinak dituzten Euskal Herriko hiru ferra-saguzar espezieen gazte eta helduen dietak erkatu ditugu: *Rhinolophus euryale (*ferra-saguzar mediterranearra), *R. ferrumequinum* (ferra-saguzar handia) eta *R. hipposideros* (ferra-saguzar txikia), hurrengo helburuei erantzuteko:

1) Nola garatzen da espezie bakoitza?
2) Ezberdintasunik al dago espezie bakoitzaren gazte eta helduen arteko dieten artean?
3) Antzekoak al dira hiru espezieen gazteen dietak? Txikiak, hegalari mantsoak…

3. Ikerketaren muina

3.1 Laginketa

Ikerketa honen aztergai diren ferra-saguzarren gorotzak, 2021. eta 2022. urteetako uztaila eta abuztua bitartean jaso genituen. Horretarako, espezie hauen kolonia ezagunetan lagindu genuen, Karrantzan (Bizkaia) eta Matxinbentan (Gipuzkoa). Saguzarrak gaueko ehiza-saioetatik babeslekura itzultzen ari zirela harrapatu genituen, harpa-sarez; gehienez ordubetez oihalezko poltsetan banaka bananduta mantendu genituen, bertan gorotza egin zezaten. Animalien tamaina, sexua eta garapenarekin lotutako ezaugarrien informazioa hartu ondoren, babeslekuan bertan askatu genituen, inolako kalterik eragin gabe. Guztira 70 ferra-saguzar handi (29 gazte eta 41 heldu); 44 ferra-saguzar txiki (23 gazte eta 21 heldu) eta 45 ferra-saguzar mediterranear (26 gazte eta 19 heldu) lagindu genituen. Gorotz indibidualak izoztuta gorde genituen, jaso eta 6 orduren buruan, gehienez jota.

3.2 Garapen eredua

Laginketan, lehenik, gazte eta helduak banatu genituen, ilearen kolorean (gris argia gazteentzat, marroia helduentzat) eta epifisiaren osifikazioan (alegia, besoetako hezurren heltze-mailan) oinarrituta. Gazteei epifisiaren argazkiak atera eta deiak grabatu genizkien ultrasoinuen mikrofono batekin (u256 Ultrasound Microphone, Petterson Elektronik AB), ondoren analizatzeko. Pisua eta besaurrearen-luzera neurtu genizkien eta banakoen sexua identifikatu genituen. Gerora, epifisien argazkietan kartilagozko gunearen tamaina neurtuz (milimetrotan)

osifikazio-maila kalkulatu genuen. Bestetik, saguzarren frekuentzia soinuaren potentzia-espektrogramaren bitartez neurtu genuen BatSound (Petterson Elektronik AB) programa erabiliz.

Espezie bakoitzean ezaugarrien arteko erlazioak (Frekuentzia (F), pisua (PS), besagain-luzera (BL) eta osifikazio-maila (OM)) aztertu genituen eta, bestalde, sexuaren eragina aztertu genuen. Emaitzek ferra-saguzar espezie bakoitzean garapenaren parametroak modu ezberdinean erlazionatuta daudela erakusten dute, garapen-eredu ezberdinak dituztela islatuz (1. taula):

- Mediterranearra: Frekuentziak eta osifikazio-mailak bakarrik erakusten dute korrelazio esanguratsua.
- Txikia*:* Frekuentzia besagainaren-luzerarekin dago korrelazionatuta eta, bestetik, osifikazio-maila pisuarekin. Horrez gain, besagainaren-luzerak eta pisuak ere korrelazioa (ahula) erakusten dute. Bestalde, emeek arrek baino besagain luzeagoak dituzte eta frekuentzia altuagoetan igortzen dute, hau da, gainerako espezieek ez bezala, dimorfismo sexuala erakutsi dute.
- Handia*:* Frekuentziak korrelazio esanguratsuak erakutsi ditu osifikazio mailarekin eta pisuarekin eta, bestalde, besagainaren-luzerak ere korrelazio esanguratsuak erakutsi ditu bi parametro horiekin.

1. taula. Garapen parametroen arteko korrelazioak espezie bakoitzean. (F: Frekuentzia; PS: Pisua; BL: Besagain-luzera; OM: Osifikazio-maila). Berde kolorez (++) erlazio altuko ezaugarriak, eta hori kolorez (+) erlazio ahuleko ezaugarriak.

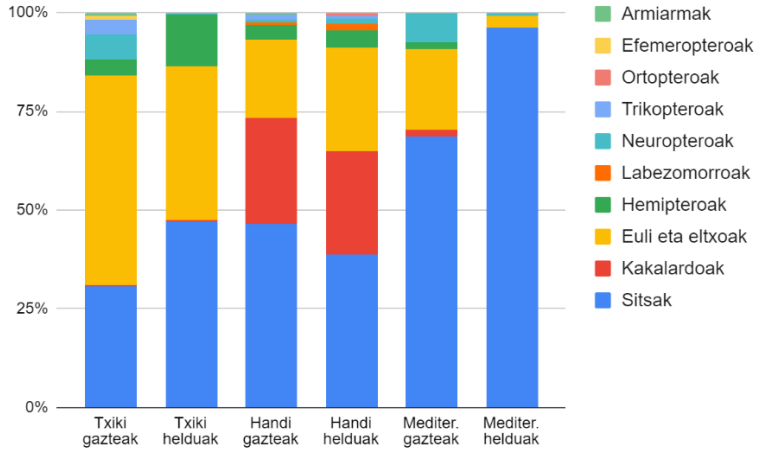
	Mediterranearra				**Txikia**				**Handia**			
	AF	PS	BL	OM	AF	PS	BL	OM	AF	PS	BL	OM
AF				++			++			++		++
PS							+	++			++	
BL												++
OM												

3.3 Dietaren konposizioa

Saguzarren dieta beren gorotzetako DNA aztertuz analizatu genuen, DNA horrek islatzen baitu zein espeziez elikatu den. Funtsean, gorotzetatik DNA erauzi, mitokondrioetako COI genearen zati txiki bat atera, eta hau sekuentziatuz identifikatu genituen jandako espezieak. DNA erauzketa Kingfisher kitaren (ThermoFisher) bitartez egin genuen. Ondoren, DNAren anplifikazioa bi hasle sorta generalista erabiliz (Jusino et al., 2019, Vamos et al., 2017) egin genuen eta sekuentziazio masiboa *Illumina MiSeq NGS* (2x250 bp (500 ziklo)) plataformaren bidez. Sekuentzia gordinak bioinformatikoki landu ostean OTUak (Operational Taxonomic Units) eraiki genituen, antzeko sekuentziak elkartuz. OTU horiei espezieak esleitu eta saguzarren dieta zehazteko bi datu-base kontsultatu genituen (Genbank eta Bold). Horrela saguzar bakoitzak jandako espezieen zerrenda eta proportzioen hurbilketa bat lortu genuen.

Behin oinarrizko informazio hau eskuratuta, hiru saguzar espezieen dietak karakterizatu genituen. Emaitzak agerpenen ehuneko zamatuetan adierazi genituen, hau da, harrapakin taxoi bakoitzaren agerpenak taxoi guztien agerpen kopuru totalaz zatituz lortutako ehunekoa (Deagle et al., 2018). Gainera, taxoi bakoitzaren agerpen maiztasuna kalkulatu genuen, taxoi bakoitza zenbat laginetan agertzen den kalkulatu eta horren ehunekoa adieraziz (Deagle et al., 2018). Datu hauekin, dietak alderatu genituen espeziea, adina eta sexua parametro bezala hartuta. Horrela espezie bereko gazteen eta helduen arteko dieten antzekotasuna (2. helburua) eta espezieen arteko dieten antzekotasunak (3. helburua) aztertu genituen.

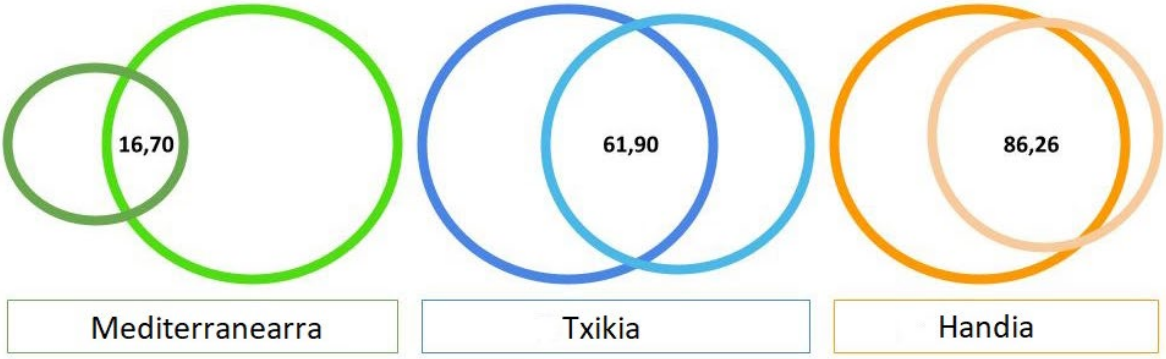
1. irudia. Espezie eta adin klase bakoitzaren dietaren osaera (agerpenen ehuneko zamatua).



Espezie barneko aldakortasuna

Garapen fisiko eredu ezberdinak erakusten dituzten moduan, saguzar bakoitzaren dietari dagokionean ere patroiak oso ezberdinak dira. Gazte eta helduen arteko dieten konposizioa orden mailan alderatzean (1. irudia), saguzar bakoitzaren joera ezberdina dela sumatzen da. Harrapakin espezie mailako azterketa egitean, hala, saguzar bakoitzak oso eredu ezberdina duela ikusi dugu. Mutur batean ferra-saguzar mediterranear gazteek eta helduek oso dieta ezberdinak erakusten dituzte (%16,70 gainezarpena) (2. irudia). Beste muturrean ferra-saguzar handien bi adin taldeek oso gainezarpen handia erakusten dute (%86,26) (2. irudia). Bien artean ferra-saguzar txikia kokatzen da, %61,90-eko gainezarpenarekin.

2. irudia. Gazte eta helduen dieten gainezarpena, harrapakin amankomunen portzentaia. Kolore ilunez eta ezkerrean helduen dietak, argiz eta eskuinean gazteena.



Espezieen arteko aldakortasuna

Hiru espezieak ehiztari espezializatuak dira, eta hortaz, haien arteko dieten gainezarpena nahiko txikia da (%23) (2. taula). Dieten orden mailako konposizioan ikus daitekeen moduan (1. irudia), ferra-saguzar mediterranearra sits-espezialista da, ferra-saguzar txikiak horiez gain, euli eta eltxo ugari ehizatzen ditu eta, azkenik, ferra-saguzar handiaren dietan, aurreko ordenekin batera, kakalardoek pisu handia hartzen dute.

Analisi estatistikoak gazteen zein helduen arteko dietak esangarriki ezberdinak direla adierazten du. Hala ere, gazteen arteko gainezarpena helduena baino %10 handiagoa da (2. taula). Gazteen artean dieta antzekoenak mediterranearrak eta txikiak dituzten bitartean (%37,24), antzekotasun baxuena handiak eta mediterranearrak erakusten dute (%15,23). Helduen artean ferra-saguzar handia eta txikia dira

gainezarpen handiena erakusten dutenak (%30,05), eta berriz ere, handiaren eta mediterranearraren dietak ezberdinenak, haien artean kasik antzekotasunik ez dutelarik (%2,52).

2. taula. Espezieen arteko dieten gainezarpen indizea (agerpenen ehuneko zamatuetan oinarrituz). (Reu: *R. euryale* (mediterranearra); Rfe: *R. ferrumequinum* (handia); Rhi: *R. hipposideros* (txikia)). Grisez antzekotasun handiena erakusten dutenak.

Gainezarpena (%)	Orokor	Gazte	Heldu
Reu-Rfe-Rhi	23,07	25,19	14,33
Reu-Rfe	10,45	15,23	2,52
Reu-Rhi	26,75	**37,24**	10,42
Rfe-Rhi	**32,03**	23,11	**30,05**

4. Ondorioak

1) Genero bereko hiru espezie izan arren, espezie bakoitzak oso garapen eredu ezberdinak erakusten dituela ikusi dugu. Ferra-saguzar txikiaren kasuan dimorfismo sexual nabaria ikusi dugu, gazte zein helduetan, emeak arrak baino handiagoak izanik eta frekuentzia altuagoak erabiltzen zituztelarik. Aldiz, gainerako bi espezieetan aztertutako aldagaietan ez dugu ar eta emeen artean ezberdintasunik ikusi.
2) Gazte eta helduen arteko dieten ereduak ere ezberdinak dira espezietik espeziera. Ferra-saguzar handienak oso antzekoak diren bitartean, mediterranearrenak oso bestelakoak dira. Horrek aditzera eman diezaguke espezializazioa modu ezberdinetan ematen dela. Hau da, mediterranear gazteek ikasketa prozesu sakona izango dute helduen espezializazio maila lortzeko, eta aldiz handietan espezializazioa ehizan hasi aurretik emango da, berezko ezaugarri fisikoek baldintzatuta ziurrenik. Txikiari dagokionean, aldiz, ar edo emea izateak dietan eragina izango du.
3) Gazteen arteko dieta helduena baino antzekoagoa dela ikusi da. Hala ere, espezializazio maila handia erakusten jarraitzen dute. Ziurrenik, helduek jaten dituzten harrapakin berezienak (maneiu eta espezializazio maila handienarekin lotutakoak) ez dituzte kontsumituko, eta aldiz, harrapakin "erraz" gehiago konpartituko dituzte, horrek dieten antzekotasuna handituz.

5. Etorkizunerako planteatzen den norabidea

Dietaren espezializazioan aldagai garrantzitsuenak zeintzuk diren ikusi nahiko genuke:

- Saguzarren ekokokapena eta tamainaren garapenak dauka eragina? Hala izatekotan, zein da harrapakinen hautespena gehien baldintzatzen duen aldagaia?
- Hala ikasketarekin erlazionatuta dago? Hau da, hegakeran trebatzeak eta ekokokapena modu berezi batean erabiltzeak baimentzen al du espezializazioa?
- Nola erlazionatzen dira saguzarren ezaugarriak harrapakinen ezaugarriekin? Ze motatako harrapakinak hobesten ditu saguzar espezie bakoitzak garapenaren fase bakoitzean? (handiak/txikiak, gogorrak/bigunak, hegalari azkarrak/ez hegalariak, basokoak/zabalekoak…)

Horretarako, saguzarren ezaugarriak eta harrapakin bakoitzaren ezaugarriak erkatu beharko genituzke. Horrela, taxonomian oinarritutako dietaren konposizioa izateaz gain, harrapakinen ezaugarri fisiko eta ekologikoetan oinarritutako dieten irudia lortuko genuke.

6. Erreferentziak

Arrizabalaga-Escudero, A., Merckx, T., García-Baquero, G., Wahlberg, N., Aizpurua, O., Garin, I., ... & Aihartza,

J. (2019). Trait-based functional dietary analysis provides a better insight into the foraging ecology of bats. *Journal of Animal Ecology*, 88(10), 1587-1600.
Bell, O., Jones, M. E., Ruiz-Aravena, M., Hamede, R. K., Bearhop, S., & McDonald, R. A. (2020). Age-related variation in the trophic characteristics of a marsupial carnivore, the Tasmanian devil Sarcophilus harrisii. *Ecology and Evolution*, *10*(14), 7861-7871.
Blaxter, M., Mann, J., Chapman, T., Thomas, F., Whitton, C., Floyd, R., & Abebe, E. (2005). Defining operational taxonomic units using DNA barcode zenta. Philosophical Transactions of the Royal Society B: *Biological Sciences*, 360(1462), 1935-1943.
Buchler, E. R. (1980). The development of flight, foraging, and echolocation in the little brown bat (Myotis lucifugus). *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 6(3), 211-218.
Deagle, B. E., Thomas, A. C., McInnes, J. C., Clarke, L. J., Vesterinen, E. J., Clare, E. L., ... & Eveson, J. P. (2019). Counting with DNA in metabarcoding studies: How should we convert sequence reads to dietary zenta?. *Molecular ecology*, 28(2), 391-406.
Dietz, C., & Kiefer, A. (2016). Bats of Britain and Europe. *Bloomsbury Publishing*.
Duverge, P. L. (1996). *Foraging activity, habitat use, development of juveniles, and diet of the greater horseshoe bat (Rhinolophus ferrumequinum-Schreber 1774) in south-west England* (Doctoral dissertation, University of Bristol).
Gould, E. (1971). Studies of maternal-infant communication and development of vocalizations in the bats Myotis and Eptesicus. *Communications in Behavioral Biology*, 5, 263-313.
Jackson, A. C., Rundle, S. D., Attrill, M. J., & Cotton, P. A. (2004). Ontogenetic changes in metabolism may determine diet shifts for a sit-and-wait prezentor. *Journal of Animal Ecology*, 73(3), 536-545.
Jones, G. (1990). Prey selection by the greater horseshoe bat (Rhinolophus ferrumequinum): optimal foraging by echolocation*?. The Journal of Animal Ecology*, 587-602.
Jusino, M. A., Banik, M. T., Palmer, J. M., Wray, A. K., Xiao, L., Pelton, E., ... & Lindner, D. L. (2019). An improved method for utilizing high-throughput amplicon sequencing to determine the diets of insectivorous animals. *Molecular ecology resources*, 19(1), 176-190.
Kunz, T. H. (1974). Reproduction, growth, and mortality of the vespertilionid bat, Eptesicus fuscus, in Kansas. *Journal of Mammalogy*, 55(1), 1-13.
Pyke, G. H., Pulliam, H. R., & Charnov, E. L. (1977). Optimal foraging: a selective review of theory and tests. *The quarterly review of biology*, 52(2), 137-154.
Vales, D. G., Cardona, L., García, N. A., Zenteno, L., & Crespo, E. A. (2015). Ontogenetic dietary changes in male South American fur seals Arctocephalus australis in Patagonia. *Marine Ecology Progress Series*, 525, 245-260.
Vamos, E. E., Elbrecht, V., & Leese, F. (2017). *Short COI markers for freshwater macroinvertebrate metabarcoding* (No. e3037v2). PeerJ Preprints.
von der Emde, G., & Menne, D. (1989). Discrimination of insect wingbeat-frequencies by the bat Rhinolophus ferrumequinum. *Journal of Comparative Physiology* A, 164(5), 663-671.
Werner, E. E., & Gilliam, J. F. (1984). The ontogenetic niche and species interactions in size-structured populations. *Annual review of ecology and systematics*, 15, 393-425.

7. Eskerrak eta oharrak

Ikerketa hau Eusko Jaurlaritzako Ikerketa Taldeak (IT1571-22) diruz lagundu du. Eskerrak eman nahi dizkiet Euskal Herriko Unibertsitateari eta Zientzia eta Teknologia Fakultateari. SGIKER-eko genomikako saileko Irati eta Fernandori eskerrak laginak lantzeagatik. Eskerrik zintzoenak Joxerra Aihartza zuzendariari ikerlan honen bidean izan ditugun gorabehera guztietan berme izanagatik. Nerea Vallejori bioinformatika eta estatistikan ordenagailuarekin izandako borrokak errazteagatik. Azkenik, laginketetan lagundu zidaten Nere Zorrozua eta Iratxe Rojori, eta “Jokamoldearen ekologia eta eboluzioa” departamentuko kideei bidean kide eta lagun izanagatik.

Mintzeko-kolesterola: bakterio-toxinen aspaldiko laguna

Jone Amuategi Aulestiarte[1,2], Rocio Alonso Estrada[2,3], Helena Ostolaza Etxabe[1,2]

1 Biokimika eta Biologia Molekularra saila (EHU), 2 Biofisika Institutua (UPV/EHU-CSIC), 3 Biofísika Bizkaia Fundazioa
jone.amuategui@ehu.eus

Laburpena

Adenilato Ziklasa Toxina (ACT) *Bordetella pertussis* bakterioak jariatzen dituen birulentzia-faktoreetako bat da. Ostalariaren defentsak ahultzen ditu, makrofagoak intoxikatuz eta haien mintz plasmatikoak zulatuz. Horretarako, lehen eta azken urratsa proteina itu-zelulen mintz plasmatikora lotu eta mintzean integratzea da. Arloko ikerketan aurrerapauso handiak egin diren arren, ezezagunak dira toxinak forma aktiboa har dezan gertatu beharreko urratsak. Lan honetan, ACTk eta mintzeko kolesterolak elkarrekintza espezifikoa dutela erakutsi dugu, eta kolesterolari lotzeaz arduratzen diren lau motibo identifikatu ditugu, bi jardueretarako funtsezkoak direnak.

Gako-hitzak: kolesterola; bakterio-toxinak; toxina poro-eragileak; lipido-proteina elkarrekintzak

Abstract

Adenylate Cyclase Toxin (ACT) is one of the main virulence factors secreted by Bordetella pertussis, the bacterium causative of whooping cough. It intoxicates and forms pores in the plasma membrane of macrophages, debilitating host defences. The first and last step for these toxin activities are binding to the plasma membrane of target cells and conversion into membrane-integrated proteins. However, the molecular determinants in the protein or the target membrane that govern this conversion to an active toxin form are fully unknown. Here, we show that ACT specifically interacts with membrane cholesterol, and find in two membrane-interacting domains, four cholesterol-binding motifs that are essential for both activities.

Keywords: bacterial toxins; pore-forming toxins; lipid-protein interactions

1. Sarrera eta motibazioa

Toxinak zelulak kaltetzen dituzten erremintak dira eta bizi-erreinu guztietan aurki daitezke, bakterioetatik gizakietaraino. Molekula txikiak, peptidoak edo proteinak izan daitezke eta beren eginkizunak gauzatzeko mekanismo desberdinak jarraitu ditzakete. Hortaz, haien toxikotasun maila ere aldatzen da.

Ikerlan honetan, bakterioek ekoizten dituzten toxina poro-eragileak (ingelesez *Pore-forming toxins* edo PFT) izan ditugu aztergai. PFTak mintzen integritatea mehatxatzen duten proteina sofistikatuak dira, mintza alde batetik bestera gurutzatzen duten kanal urtsuak eratzen baitituzte (Dal Peraro eta van der Goot, 2016; Mondal eta Chattopadhyay, 2020) (**1. irudia**). Mintz biologikoek zelularen osotasuna eta arkitektura mantentzeko aldamio sendo eta dinamikoak osatzen dituzte, eta horiek izorratzeak zelularen heriotza eragin dezake (Bernardes eta Fialho, 2018; Kulma eta Anderluh, 2021; Zhang et al., 2018). Hori dela eta, PFTak bakterio patogenoen birulentziarako ezinbesteko tresnak dira (Gonzalez et al., 2008).

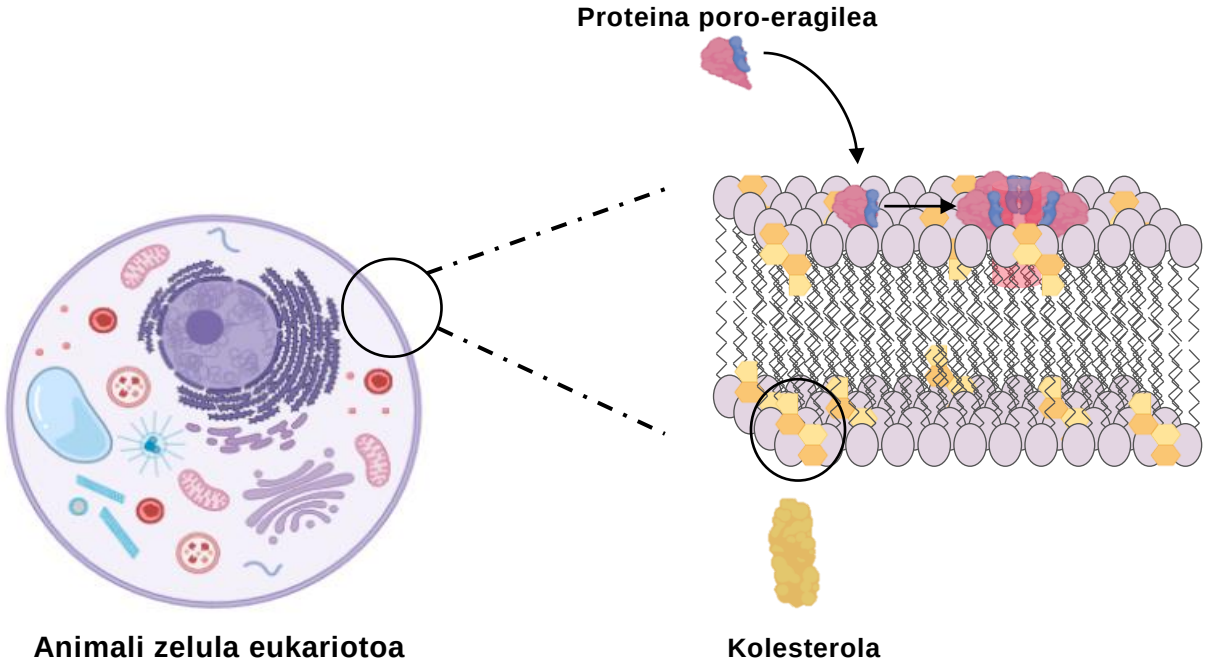
Ezaugarriei dagokienez, PFTek oso talde berezia osatzen dute; izan ere, uretan disolbagarriak diren monomero gisa jariatzen dira, baina ondoren, zelula eukariotoen mintz-plasmatikora zuzentzen dira, bertan poroak eratzeko eta zelulen lisia eragiteko (Da Peraro eta van der Goot, 2016; Gilbert et al., 2014; Parker eta Feil, 2005; Tilley eta Saibil, 2006). Horrenbestez, ingurune urtsutik mintz-ingurunera pasatzean egituraz aldatzen dira (Lata et al., 2022). Horretarako, uretatik babestuta zeuden eskualde hidrofobikoak agerian geratzen dira eta mintzean txertatzen dira.

Mota honetako toxinen artean aski ezagunak dira kolizinak, zitolisinak, hemolisinak, difteria toxina, antrax toxinaren babes-antigenoa edota *Repeats in ToXins* (RTX) familiako PFTak (Lata et al., 2022).

PFTek, askotan, mintzeko lipidoen laguntza izaten dute, bigeruzan behar bezala txerta daitezen. Lipidoek prozesua zuzenean nahiz zeharka doi dezakete, hain zuzen ere. Alde batetik, proteinekin modu espezifikoan elkarreragin dezakete (Laganowsky et al., 2014; Renard eta Byrne, 202; Sych et al., 2022) eta bestetik, mintzaren ezaugarri biofisikoak (jariakortasuna, fase-bereizketa, lodiera, tentsioa, etab.) modulatu ditzakete (Escribá et al., 2008; Janmey eta Kinnunen, 2006; Salas-Estrada et al., 2018). Beraz, proteinaren egitura eta funtzioa alda ditzakete.

Kolesterolak (Chol), esaterako, era askotako mintz-hartzaileen jarduera kontrolatzen du, interakzio espezifikoen bidez. Halaber, zenbait proteinek kolesterola espezifikoki ezagutzen duten eskualdeak eduki ditzakete: neurotransmisoreen hartzaileek eta ABC (ingelesez *ATP-binding cassette*) garraiatzaileek, adibidez. Eskualde horiek CRAC (ingelesez *Cholesterol Recognition Amino acid Consensus*) edo alderantzizko CARC motibo gisa izendatzen dira eta askotariko egiturak dituzten arren, kolesterolari lotzeko antzeko mekanismoak erabiltzen dituzte. Literaturan irakur daitekeenez, zenbait aminoazido sarritan agertzen da segmentu horietan, jada ezaguna den eta deskribatuta dagoen patroi bat jarraituz (Fantini et al., 2016; Fantini eta Barrantes, 2013).

1. Irudia. Proteina poro-eragileen jarduna.

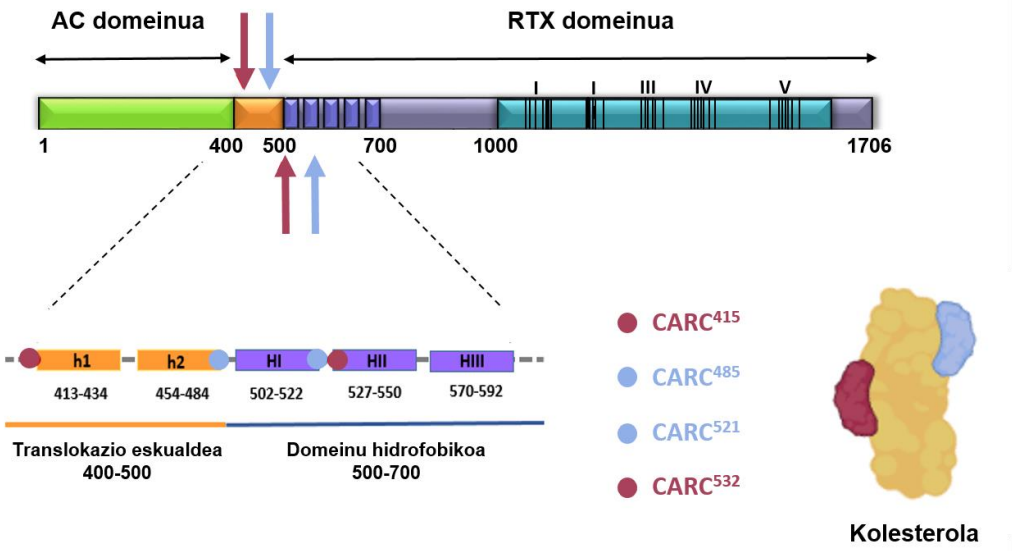


2. Arloko egoera eta ikerketaren helburuak

Lipido eta proteinen arteko elkarrekintzak interes handia sortu du aspaldidanik. Ikertzaile askok mintzeko lipidoen eta proteinen arteko interakzioan jarri dute arreta, hain zuzen ere, eta horien arteko mekanismo molekularrak deskribatzen saiatu dira. Izatez, interes handiko gaia da gaur egun ere eta hainbat diziplina zientifiko uztartzen ditu: biokimika, biofisika, zelulen biologia eta bioinformatika, besteak beste.

Lan honetan, *Bordetella pertussis* bakterio patogenoak jariatutako Adenilato Ziklasa Toxinak (ingelesez *Adenylate Cyclase Toxin* edo ACT) mintzeko kolesterolarekin elkarrekintza espezifikoa ezartzen duela frogatu dugu. Bestalde, ACTk mintzekin elkarrekiteko dituen bi segmentutan, translokazio eskualdean eta domeinu hidrofobikoan, kolesterola espezifikoki errekonozitzen duten lau motibo deskribatu ditugu (**2. Irudia**).

2. irudia. ACTren aminoazido sekuentzia eta intereseko CRAC/CARC motiboak.



Patogeno honek kukutxeztula izeneko arnasbideetako infekzio kutsakor eta hilgarria eragiten du gizakietan. Garrantzitsua da bakterioa eta hark ekoiztutako birulentzia faktoreak ikertzea, arnasbideetako infekzioak munduan heriotza gehien eragiten duten gaixotasun kutsakorren artean daude eta. Bide horretan ekarpena egiteko asmoz, gure taldean ACT toxinaren egitura eta zelulak kaltetzeko darabilen mekanismo molekularra zein diren ikertu nahi izan dugu.

Jakin badakigu proteina hau RTX familiako PFT bat dela, makrofagoak intoxikatzen dituela eta haien mintz plasmatikoak zulatzen dituela (Chenal, 2018). Horrez gain, bere aktibitate zitotoxiko eta zitolitikoa kolesterolaren menpe daudela ere deskribatu da (González Bullón et al., 2021). Aitzitik, orain arte ezin izan dugu zehaztu ACT eta kolesterolaren arteko elkarrekintza zuzena edo zeharkakoa ote den. Horrexegatik, hemen, ACT kolesterolari zuzenean lotzen al zaion aztertu nahi izan dugu.

Helburu espezifikoei dagokienez, lehenbizi, proteinak kolesterolik gabeko mintzetan eta kolesteroldunetan daukan portaera aztertu nahi izan dugu. Horrez gain, CRAC/CARC motiboek patroi ezaguna dutenez, bioinformatika erabili dugu ACTren sekuentzian eskualde horiek bilatzeko. Orain arteko ikerketa-ibilbideak translokazio eskualdean eta domeinu hidrofobikoan halako lau motibo koka litezkeela pentsatzera garamatza (**2. Irudia**). Hortaz, lan honetan motibo horiek identifikatu eta deskribatu nahi izan ditugu. Izan ere, toxina mintzean txertatzen eta haren egitura egonkortzen lagun dezaketela uste dugu (Amuategi et al., 2022).

3. Ikerketaren muina

3.1 ACT eta kolesterolaren artean elkarrekintza espezifikoa dago

Hasteko, ACT eta kolesterolaren arteko lotura zuzena eta espezifikoa dela frogatzeko, ACTk hainbat konposiziotako liposomei lotzeko daukan gaitasuna aztertu dugu (**3A. Irudia**). Horretarako, proteina zenbait konposiziotako liposomekin inkubatu da eta ondoren, laginak, sakarosa gradientea erabiliz, zentrifugatu dira. Honi esker, liposomei loturiko proteina eta proteina askea bereizten dira. Azkenik, zentrifugaziotik jasotako laginak frakzioetan banatu eta SDS-PAGE gel batean kargatu dira. Ondoren, banda bakoitzaren intentsitatea kuantifikatu eta lotutako proteinaren ehunekoa kalkulatu da.

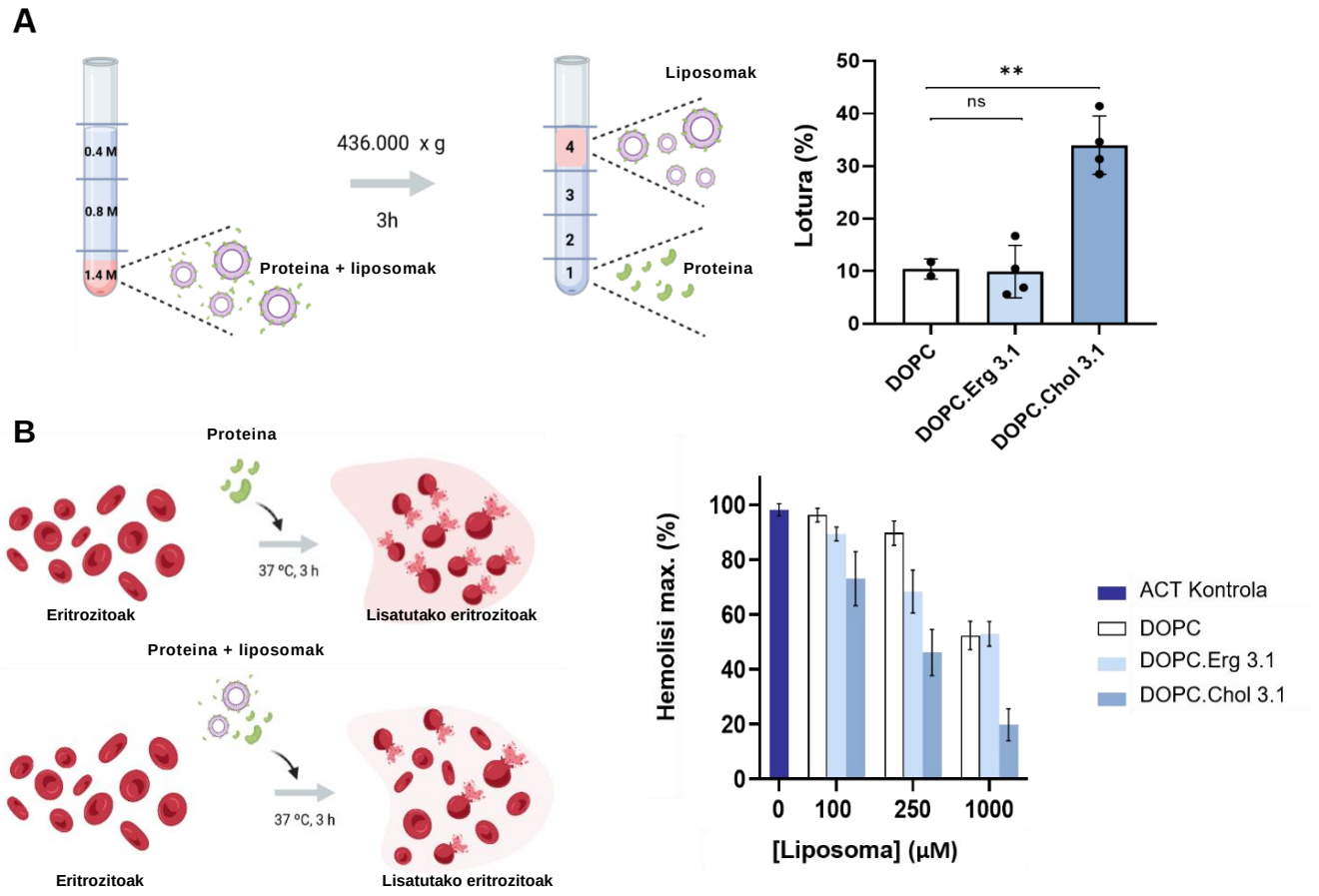
3A. Irudian erakutsitako emaitzek argi erakusten dute proteina fosfolipido hutsezko (DOPC) mintzetan baino hobeto lotzen dela % 25 kolesterola dutenetan, desberdintasuna estatistikoki esangarria izanik. Bestalde, kolesterolaren analogoa den ergosterolari (Erg) ere oso gutxi lotzen da.

Emaitza hauek osatzeko asmoz, ACTk eritrozitoak zulatzeko daukan gaitasuna neurtu da. Horretarako, espektrofotometriaren bidez, laginen uhertasunaren jaitsiera neurtu da eta eskuratutako

datuak zelulen heriotza bezala interpretatu dira. Kasu honetan, lehian oinarritutako esperimentu bat burutu da. Izan ere, hemolisi zinetika neurtu aurretik, ACT konposizio desberdinetako liposomekin inkubatu da (**3B. Irudia)**. Beraz, proteina liposomei lotuz gero, ezin izango da eritrozitoen mintzera lotu haiek zulatzeko.

Horrenbestez, esperimentu hauetatik ondokoa ondoriozta dezakegu: ACTren hemolisi gaitasuna nabarmen jaisten da aldez aurretik kolesteroldun liposomekin inkubatzen dugunean. DOPC hutsezko eta DOPC.Erg 3.1 konposizioko mintzek, berriz, hemolisia gutxitzeko antzeko gaitasuna dutela ikusi dugu.

3. irudia. ACTren lotura eta hemolisi entseguak.



3.2 Kolesterolaren errekonozimendurako motiboak mutatzean ACTren aktibitatea aldatzen da

Aurreko atalean, ACT eta kolesterolaren arteko elkarrekintza espezifikoa dela baieztatu dugu. Hemen, arestian aipaturiko CRAC eta CARC motiboen identifikazioa eta deskribapena egin dugu.

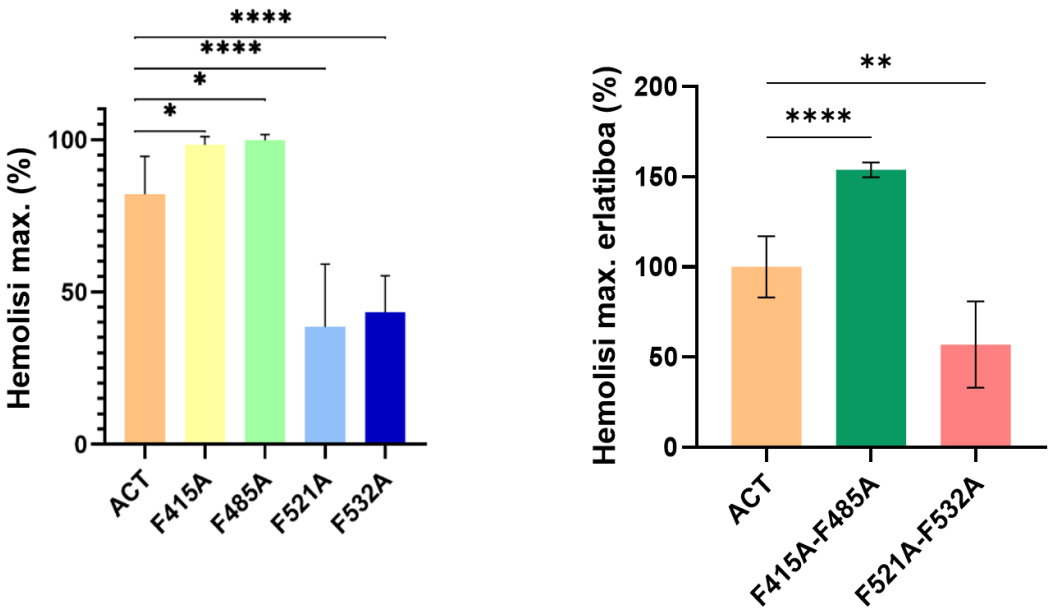
ACTk mintzekin elkarrekiteko dauzkan eskualdeetan kolesterola espezifikoki ezagutu zezaketen CRAC/CARC motiboen bilaketa egina genuen jada (Amuategi et al., 2021). Oraingoan, **2. Irudian** ageri diren lau motiboetan jarri dugu arreta. Literaturan irakur daitekeenez, eskualde hauetan ageri diren fenilalanina edota tirosina zentralak aldatuz gero, proteinen eta kolesterolaren arteko elkarrekintza gutxitu edo ezabatu daiteke (Fantini et al., 2016; Fantini eta Barrantes, 2013). Hori dela eta, ACTren zenbait proteina mutante eskuratu ditugu, motibo bakoitzeko aminoazido bat edo bi eraldatuz. Kasu guztietan fenilalanina (F) alaninarengatik (A) aldatu dugu.

Lehenengo, mutatutako proteinen hemolisi gaitasuna aztertu dugu, 3 ordutako hemolisi zinetikak jarraituz. **4. irudian** ikus daitekeenez, F521A. eta F532A mutazioek proteinaren lisi-

gaitasuna nabarmen murriztu dute. Aitzitik, F415A eta F485A mutanteek proteina basatiak baino jarduera litiko handiagoa erakutsi dute. Bi mutazio dituzten proteinen kasuan, F521A-F532A mutazio bikoitzak proteinaren hemolisi gaitasuna ia erdira jaitsi du. Halere, mutazio horien efektua ez da gehigarria izan eta beraz, kolesterolari lotzeko eskualde horietako bat galtzea nahikoa da ACTk poroak eratzeko daukan gaitasuna gal dezan. F415A-F485A mutantearekin lortutako emaitzek berriz, mutazio horien efektua gehigarria dela adierazi dute, hemolisi maximoa nabarmen handitu baita.

Datu hauetan oinarrituz, kolesterola ezagutzen duten $CRAC^{521}$ eta $CARC^{532}$ motiboak proteinaren aktibitate poro-eragilerako beharrezkoak direla pentsa daiteke, ziurrenik, mintzetan txertatzen direlako eta poro egituraren parte direlako.

4. irudia. ACTren CRAC eta CARC mutanteen hemolisi gaitasuna.

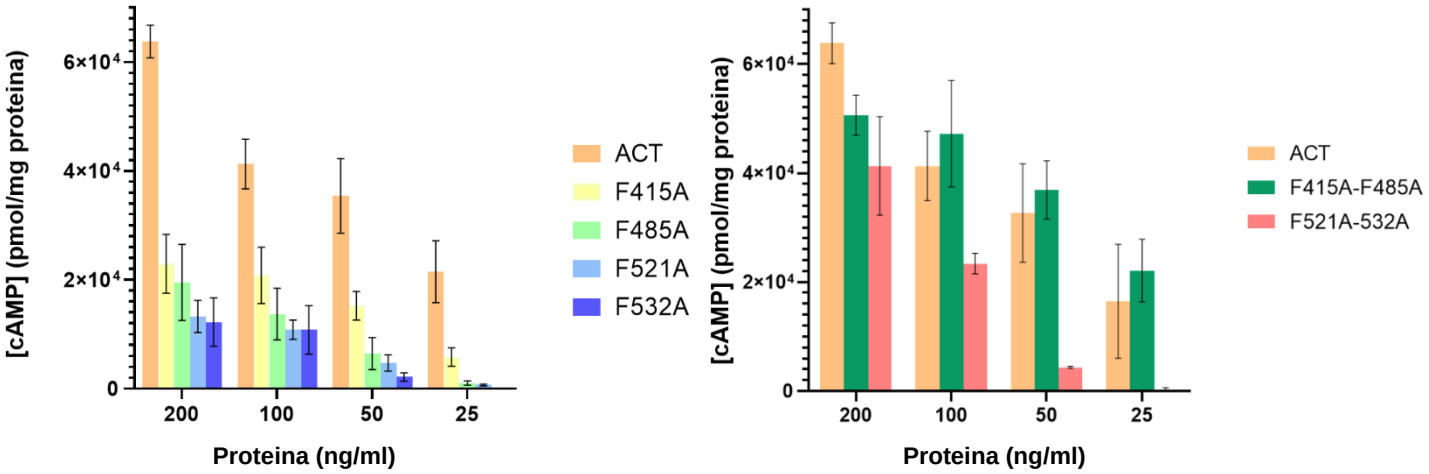


Irudietan erakusten ez den arren, proteina mutanteek kolesteroldun mintzei lotzeko duten gaitasuna proteina basatiaren antzekoa dela frogatu dugu (Amuategi et al. 2022). Beraz, loturan hainbat CRAC/CARC motibok parte hartzen dutela pentsa genezake.

Bestalde, proteinaren aktibitate zitotoxikoari erreparatzeko, proteina mutanteek makrofagoetan AMP ziklikoa (cAMP) sintetizatzeko duten gaitasuna aztertu dugu. Izan ere, literaturan deskribatu denez, toxina honek zelula ostalariaren zitosolean cAMPren gehiegizko sintesia eragiten du, zelularen heriotza eraginez (Ladant eta Ullmann, 1999).

Esperimentua gauzatzeko, makrofagoak proteinekin inkubatu eta sintetizatutako cAMP kontzentrazioa neurtu dugu, kit espezifiko bat erabiliz. **5. Irudian** ikus daitekeenez, mutazio puntualek nabarmen jaitsi dute cAMP ekoizpena. Bi mutazio dituzten proteinen emaitzak aztertuz, berriz, F415A-F485A mutantearen kasuan jaitsiera ez da horren nabarmena izan; F521A-F532A mutantearen kasuan, aldiz, bai. Ondorioz, identifikaturiko CRAC/CARC motiboak proteinaren jarduera egokirako (translokaziorako nahiz hemolisirako) beharrezkoak direla baiezta dezakegu.

5. irudia. ACTren CRAC eta CARC mutanteen translokaziorako gaitasuna.



4. Ondorioak

PFTak ikertzeak proteinen egitura aldaketak hobeto ulertzeko balio izan du, oro har. Izan ere, egitura aldatzen duten beste proteina batzuek ere antzeko mekanismoak erabiltzen dituzte: ornodunen immunitate sistemako hainbat proteinek eta proteina amiloideek, besteak beste (Lashuel eta Lansbury, 2006; Rosado et al., 2007).

Aurretik ere bagenekien ACTren jarduera litikoa eta zitotoxikoa mintzeko kolesterol kontzentrazioaren menpe zeudela; alta, ez genekien kolesterolak eragin zuzenik ba ote zuen jarduera horietan. Ikerketa honetan aurkeztutako emaitzei esker, badakigu ACT toxina mintzeko kolesterolari espezifikoki lotzen zaiola eta horretarako lau motibo funtzional erabiltzen dituela. Aipaturikoak ACTk mintzekin elkarrekiteko erabiltzen dituen bi eskualdetan kokatzen dira: translokazio eskualdean eta domeinu hidrofobikoan. Hala ere, badirudi motibo hauek ez direla RTX familiako beste toxinetan ageri eta beraz, toxina honen berezkoak direla (Amuategi et al. 2022).

Motibo horiek toxinaren funtzionamendu egokirako ezinbestekoak direnez, ACT kolesterolari lotzeko giltza izan daitezke. Horrenbestez, toxina honen aktibitatea murrizteko itu molekular aproposa izan litezke. Kukutxeztula bezalako gaixotasun kutsakor eta hilgarriei aurre egiteko, patogenoen erasorako tresneria eta mekanismoak zein diren argi ulertzea premiazkoa da.

5. Etorkizunerako planteatzen den norabidea

Etorkizunean, aipatutako lau CRAC/CARC motibo isolatuek mintz-ingurunean daudenean duten egitura eta portaera aztertu nahi ditugu. Horretarako, 20-30 aminoazidoko peptido sintetikoak lortu ditugu eta haien egitura sekundarioa analizatzen ari gara transmisiozko espektroskopia infragorria (FT-IR) erabiliz. Kolesterolaren presentziak motibo horien egituran aldaketarik eragiten al duen aztertuko dugu. Era berean, sekuentzia horiek mutatzeak peptidoen egituran izan ditzakeen efektuak ere aztertuko ditugu. Bestalde, segmentu horiek mintzetan hartzen duten orientazioari eta topologiari ere erreparatu nahi diegu, horretarako, *Attenuated Total Reflectance* (ATR) espektroskopia infragorria erabiliz.

Azkenik, motibo horien ezaugarri funtzionalak ikertzeko asmoz, proteina osoaren aktibitatea inhibitzeko gai ote diren ikertuko dugu, makrofago nahiz eritrozitoetan. Finean, tesi proiektu honen helburu nagusia, AC domeinuaren mintzean zeharreko translokazioa urratsez urrats deskribatzea da eta translokaziorako eredu errealista bat proposatzea.

6. Erreferentziak

Amuategi J., Benito A., González D., Alonso R., Martin C. eta Ostolaza H. (2021) ACT toxina eta mintzeko kolesterolaren arteko elkarrekintzaren azterketa. O. Arbelaitz, A. Latatu, M.J. Omaetxebarria, eta B. Urgell *IV. Ikergazte. Nazioarteko ikerketa euskaraz. Kongresuko artikulu bilduma, Zientziak eta Natura Zientziak*. UEU, Gasteiz, 13-20.

Amuategi, J., Alonso, R., & Ostolaza, H. (2022). Four Cholesterol-Recognition Motifs in the Pore-Forming and Translocation Domains of Adenylate Cyclase Toxin Are Essential for Invasion of Eukaryotic Cells and Lysis of Erythrocytes. *International Journal of Molecular Sciences*, *23*(15), Art. 15. https://doi.org/10.3390/ijms23158703

Bernardes, N., & M. Fialho, A. (2018). Perturbing the Dynamics and Organization of Cell Membrane Components: A New Paradigm for Cancer-Targeted Therapies. *International Journal of Molecular Sciences*, *19*(12), 3871. https://doi.org/10.3390/ijms19123871

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

Escribá, P. V., González-Ros, J. M., Goñi, F. M., Kinnunen, P. K. J., Vigh, L., Sánchez-Magraner, L., Fernández, A. M., Busquets, X., Horváth, I., & Barceló-Coblijn, G. (2008). Membranes: A meeting point for lipids, proteins and therapies. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, *12*(3), 829-875. https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2008.00281.x

Fantini, J., & 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., & Barrantes, F. J. (2016). A mirror code for protein-cholesterol interactions in the two leaflets of biological membranes. *Scientific Reports*, *6*(1), Art. 1. https://doi.org/10.1038/srep21907

Gilbert, R. J. C., Dalla Serra, M., Froelich, C. J., Wallace, M. I., & Anderluh, G. (2014). Membrane pore formation at protein-lipid interfaces. *Trends in Biochemical Sciences*, *39*(11), 510-516. https://doi.org/10.1016/j.tibs.2014.09.002

González Bullón, D., Uribe, K. B., Amuategi, J., Martín, C., & Ostolaza, H. (2021). Cholesterol stimulates the lytic activity of Adenylate Cyclase Toxin on lipid membranes by promoting toxin oligomerization and formation of pores with a greater effective size. *The FEBS Journal*, *288*(23), 6795-6814. https://doi.org/10.1111/febs.16107

Gonzalez, M. R., Bischofberger, M., Pernot, L., van der Goot, F. G., & Frêche, B. (2008). Bacterial pore-forming toxins: The (w)hole story? *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, *65*(3), 493-507. https://doi.org/10.1007/s00018-007-7434-y

Janmey, P. A., & Kinnunen, P. K. J. (2006). Biophysical properties of lipids and dynamic membranes. *Trends in Cell Biology*, *16*(10), 538-546. https://doi.org/10.1016/j.tcb.2006.08.009

Kulma, M., & Anderluh, G. (2021). Beyond pore formation: Reorganization of the plasma membrane induced by pore-forming proteins. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *78*(17), 6229-6249. https://doi.org/10.1007/s00018-021-03914-7

Ladant, D., & Ullmann, A. (1999). Bordatella pertussis adenylate cyclase: A toxin with multiple talents. *Trends in Microbiology*, *7*(4), 172-176. https://doi.org/10.1016/s0966-842x(99)01468-7

Laganowsky, A., Reading, E., Allison, T. M., Ulmschneider, M. B., Degiacomi, M. T., Baldwin, A. J., & Robinson, C. V. (2014). Membrane proteins bind lipids selectively to modulate their structure and function. *Nature*, *510*(7503), 172-175. https://doi.org/10.1038/nature13419

Lashuel, H. A., & Lansbury, P. T. (2006). Are amyloid diseases caused by protein aggregates that mimic bacterial pore-forming toxins? *Quarterly Reviews of Biophysics*, *39*(2), 167-201. https://doi.org/10.1017/S0033583506004422

Lata, K., Singh, M., Chatterjee, S., & Chattopadhyay, K. (2022). Membrane Dynamics and Remodelling in Response to the Action of the Membrane-Damaging Pore-Forming Toxins. *The Journal of Membrane Biology*, *255*(2-3), 161-173. https://doi.org/10.1007/s00232-022-00227-z

Mondal, A. K., & Chattopadhyay, K. (2020). Taking Toll on Membranes: Curious Cases of Bacterial β-Barrel Pore-Forming Toxins. *Biochemistry*, *59*(2), 163-170. https://doi.org/10.1021/acs.biochem.9b00783

Parker, M. W., & Feil, S. C. (2005). Pore-forming protein toxins: From structure to function. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, *88*(1), 91-142. https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2004.01.009

Peraro, M. D., & van der Goot, F. G. (2016). Pore-forming toxins: Ancient, but never really out of fashion. *Nature Reviews Microbiology*, *14*(2), Art. 2. https://doi.org/10.1038/nrmicro.2015.3

Renard, K., & Byrne, B. (2021). Insights into the Role of Membrane Lipids in the Structure, Function and Regulation of Integral Membrane Proteins. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(16), Art. 16. https://doi.org/10.3390/ijms22169026

Rosado, C. J., Buckle, A. M., Law, R. H. P., Butcher, R. E., Kan, W.-T., Bird, C. H., Ung, K., Browne, K. A., Baran, K., Bashtannyk-Puhalovich, T. A., Faux, N. G., Wong, W., Porter, C. J., Pike, R. N., Ellisdon, A. M., Pearce, M. C., Bottomley, S. P., Emsley, J., Smith, A. I., … Whisstock, J. C. (2007). A common fold mediates vertebrate defense and bacterial attack. *Science (New York, N.Y.)*, *317*(5844), 1548-1551. https://doi.org/10.1126/science.1144706

Salas-Estrada, L. A., Leioatts, N., Romo, T. D., & Grossfield, A. (2018). Lipids Alter Rhodopsin Function via Ligand-like and Solvent-like Interactions. *Biophysical Journal*, *114*(2), 355-367. https://doi.org/10.1016/j.bpj.2017.11.021

Sych, T., Levental, K. R., & Sezgin, E. (2022). Lipid-Protein Interactions in Plasma Membrane Organization and Function. *Annual Review of Biophysics*, *51*, 135-156. https://doi.org/10.1146/annurev-biophys-090721-072718

Tilley, S. J., & Saibil, H. R. (2006). The mechanism of pore formation by bacterial toxins. *Current Opinion in Structural Biology*, *16*(2), 230-236. https://doi.org/10.1016/j.sbi.2006.03.008

Zhang, Y., Chen, X., Gueydan, C., & Han, J. (2018). Plasma membrane changes during programmed cell deaths. *Cell Research*, *28*(1), Art. 1. https://doi.org/10.1038/cr.2017.133

7. Eskerrak eta oharrak

Artikulu hau Jone Amuategi Aulestiarteri Doktorego Tesia egiteko esleitutako EHU/UPVko PIF19/62 diru-laguntzari esker eta Helena Ostolaza Etxabek jasotako Espainiako Ekonomia eta Lehiakortasun Ministerioko BFU2017-82758-P (AEI/FEDER, UE) eta Eusko Jaurlaritzako Grupos Consolidados IT1264 -19 eta IT1720-22 proiektuei esker idatzi da. Eskerrak eman nahi dizkiot Rocío Alonso Estradari lan honen alderdi esperimentalean nahiz artikuluaren garapenean eskainitako ezinbesteko laguntzagatik; Helena Ostolaza Etxaberi, ideia planteatu eta zuzentzeagatik; Euskal Herriko Unibertsitateari eta Biofisika Institutuari esperimentuak egiteko beharrezko baliabideak eskaintzeagatik.

Artikulu hau ondorengo nazioarteko artikulutik eratorri da: Amuategi, J., Alonso, R., & Ostolaza, H. (2022). Four Cholesterol-Recognition Motifs in the Pore-Forming and Translocation Domains of Adenylate Cyclase Toxin Are Essential for Invasion of Eukaryotic Cells and Lysis of Erythrocytes. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(15), Art. 15. https://doi.org/10.3390/ijms23158703

Fotobabesleen eraginkortasuna aztertzen laser espektroskopiaren bidez

Iker Lamas[1,2], Raúl Montero[3], Maider Parra[1], Ander Camiruaga[1], Imanol Usabiaga[1], Asier Longarte[1]

Kimika Fisika Saila, Zientzia eta Teknologia Fakultatea UPV/EHU[1]

Institut Català d'Investigació Química ICIQ[2]

SGIker Laser Laborategi Berezia UPV/EHU[3]

iker.lamas@ehu.eus

Laburpena

Lan honetan fotobabesle sintetiko familia baten erlaxazio ez-erradiatzailea aztertu egin da, erradiazio ultramoretik babesteko erabilgarriak diren jakiteko. Konposatuen lasaikuntza-mekanismoak ezagutzeko, xurgapen iragankorreko espektroskopia eta denboraren araberako fluoreszentzia teknikak erabili diren bitartean, energia minimoko lasaikuntza-bideak CASSCF/CASPT2 metodoen bitartez aurreikusi egin dira. Lan honi esker, molekula sintetiko hauen babespen ahalmena ona dela demostratu da, xurgapen efizientzia handia eta fotoegonkortasun bikainak aurkezten dituzte eta.

Hitz gakoak: Espektroskopia, laserrak, fotodinamika, fotoegonkortasuna

Abstract

This work focuses on the nonradiative relaxation channel of a family of synthetic sunscreens in order to elucidate its potential photoprotective behavior. The relaxation pathways of the samples were tracked by means of transient absorption spectroscopy and fluorescence upconversion techniques, whereas the minimum energy relaxation paths were predicted by CASSCF/CASPT2 methods. This work shows the photoprotective behavior of the synthesized molecules, which is demonstrated by their high absorption efficiency and excellent photostability.

Keywords: Spectroscopy, lasers, photodynamics, photostability

1. Sarrera eta motibazioa

Erradiazio ultramoreak (UM) biomolekula ezberdinetan ondorio latzak izan ahal dituela frogatu da, egitura molekularraren aldaketak zein erradikal askeen eraketa sustatzen baitu. Gizakietan, osasun-arazo ezberdinak ekar ditzake hala nola eritema, DNAren mutazioa edota larruazaleko minbiziak: kartzinomak eta melanomak (Sinha eta Häder, 2002; Dahle eta Kvam, 2003; Rodrigues et al., 2016; Baker et al., 2017; Abiola et al., 2020). Ondorio kaltegarri hauek ekiditeko asmoz, gizakiok, beste izaki bizidunekin batera, mekanismo fotobabesle ezberdinak garatu ditugu erradiazio UM xurgatzen duten molekulen bitartez, melaninak hain zuzen ere.

Fotoegonkortasun handiko pigmentu hauek hiru talde ezberdinetan sailka daitezke: eumelaninak, feomelaninak eta neuromelaninak. Azkenengo hau burmuinean bakarrik aurkitu daitekeen bitartean, eumelanina eta feomelanina giza larruazalean daude eta, beraz, erradiazio UMren aurkako ditugun fotobabesle nagusienak dira. Edonola ere, pertsona bakoitzaren fotobabespen maila metalogenesi prozesuak erregulatzen du, erantzun genetiko honek melaninaren produkzioa egokitzeko gai baita jasaten dugun erradiazio UMren arabera. Nolanahi ere, melanogenesi prozesua bat-batekoa ez denez (3-5 egun behar dira melanina gehiago sortzeko), larruazala mindu daiteke behar bezala babestuta ez baldin badago.

Hori dela eta, gero eta interes handiagoa piztu da fotobabesle artifizialetan, bereziki naturan aurkitu daitezkeen iragazki UMen propietate fotofisiko eta fotokimikoak imitatzeko gai diren konposatu sintetikoetan. Fotobabesle komertzialetan bi talde nagusi ezberdindu daitezke dituzten UM osagai aktiboen arabera: blokeatzaile fisikoak eta xurgatzaile kimikoak. Lehenengo taldea orokorrean nanopartikula inorganikoak dira, oro har titanio dioxido (TiO_2) edo zink oxidozkoak (ZnO), erradiazio UM islatzeko gai direnak. Bigarren taldea, aldiz, fotoegonkorrak eta erradiazio UM-A/UM-B asko xurgatzeko ahalmena duten molekulak dira. Normalean, UM-A/UM-B eremu osoan zehar babesa bermatzeko, iragazki organiko ezberdinak nahasten dira konposatu

komertzialetan eta, gainera, ehundura, kolorea, aplikatzeko erraztasuna, kolorea, usaina edota urarekiko erresistentzia bermatzen duten beste osagai batzuk ere gehitzen zaie (Baker et al., 2017).

Dena den, fotobabesle komertzialen fotoegonkortasuna zein segurtasuna eztabaidan dago, ikerkuntza batzuek agerian utzi baitute benzofenonen deribatuak fotoalergikoak izan ahal direla (Heurung et al., 2014). Era berean, sinapato eta zinamatoen deribatuek fotisomerizazio prozesuen ondorioz bizitza-denbora oso luzeak dituzten fotoproduktuak sortzen dituztela behatu da denboraren araberako esperimentuekin (Rodrigues et al., 2016; Baker et al., 2017; Abiola et al., 2020). Gauzak horrela, molekula hauen dinamika kontrolatzen duten mekanismo fotofisikoak zeintzuk diren argitzeko asmoz, eta etorkizuneko fotobabesleen generazio berriari begira, molekula hauek denboran ebatzitako tekniken bidez ikertzea ezinbestekoa da.

2. Arloko egoera eta ikerketaren helburuak

Lan honetan fotobabesle UM sintetiko batzuen dinamika laser espektroskopiaren bidez aztertu da. Mota honetako molekulek xurgatutako energia modu ez-kaltegarri batean nola sakabanatu daitezkeen gai diren ulertzeak euren babes ahalmena ezagutzea ahalbidetuko digu. Horretarako, fase kondentsatuan dauden laginen dinamika ikertzeko ponpaketa-zunda metodologian oinarritzen diren bi teknika aurkeztuko dira.

2.1 Xurgapen iragankorreko espektroskopia

Xurgapen iragankorreko (TA, ingeleseko *transient absorption*) espektroskopia disoluzio diluituak kitzikatu ostean ematen diren prozesu fotofisiko eta fotokimikoak aztertzea ahalbidetzen duen ponpaketa-zunda teknika bat da. 1a. irudian ikusi daitekeen moduan, teknika honetan, lehenengo eta behin, UM-Vis ponpaketa pultsu batek aztertu nahi den molekula kitzikatzen du nahi dugun energia-mailara. Ostean, atzerapen-denbora (Δt) ezberdinetan, ponpaketarekiko espazialki gainjarrita dagoen zunda pultsua espektrometro batera zuzentzen da laginetik igaro eta gero. Beraz, zundaren intentsitate aldaketa denbora-atzerapenarekiko aztertuz gero, laginaren eboluzioa jarraitu ahal da. Aipagarria da, gas-egoerako tekniketan ez bezala, TA esperimentuetan banda zabaleko zunda pultsuak erabiltzen direla. Horretarako argi zuria ura, CaF_2 edota zafirozko leihoen bitartez sortzen da (Berera et al., 2009; Kovalenko et al., 1999). Lan honetan aurkezten diren esperimentuak egiteko, 800 nm-ko funtsezko laser-sortaren 1 μJ gutxi gorabera 2 mm-ko lodiera duen CaF_2-zko leiho batean fokuratu dira 350-tik 700 nm-ra zabaltzen den argi zuria sortzeko (Bradler et al., 2009). Ondorioz, laginaren xurgapen aldaketa aldi berean zunda uhin-luzera ezberdinetan jarraitzen denez, kitzikapenak sortutako espezien denboraren araberako UM-Vis xurgapen espektroa lor daiteke.

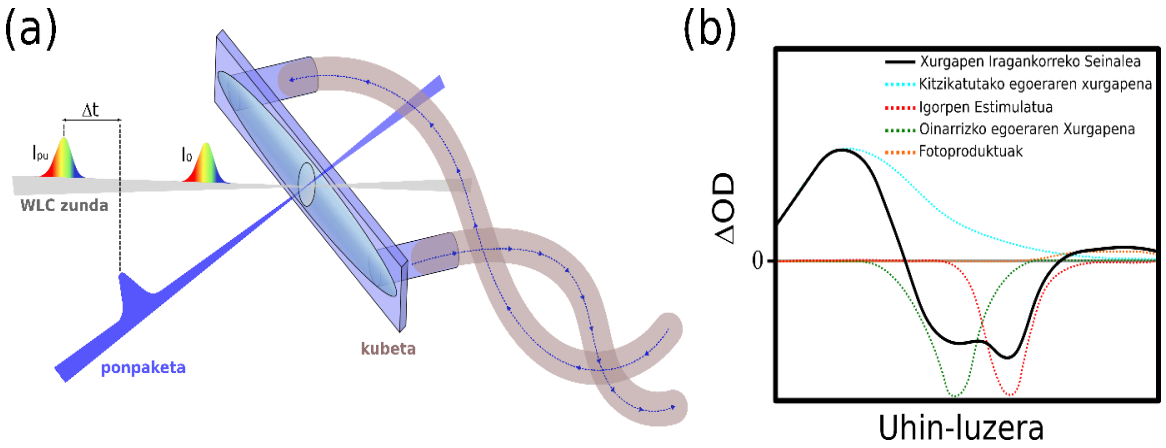
TA esperimentuetako seinalea laginaren dentsitate optikoak jasaten duen aldaketa (ΔOD) ponpaketa-zunda denbora-atzerapenarekiko bezala definitzen da:

$$\Delta OD(\lambda_{pr}, \Delta t) = -\log\left(\frac{I_{pu}(\lambda_{pr},\Delta t)}{I_0(\lambda_{pr})}\right) \quad (1)$$

non I_0 kitzikapena pairatu ez duen laginetik zehar transmititu den zundaren intentsitatea den, eta, berriz, I_{pu} kitzikatua izandako laginetik igaro ostean neurtzen den zundaren intentsitatea den (ikusi 1a. irudia).

Oro har, eskuratutako TA espektroa ΔOD-an efektua duten lau kontribuzio ezberdinen emaitza bateratua da, 1b. irudian ikusi daitekeen bezala: oinarrizko egoeraren xurgapena (GSB, *ground state bleach*), igorpen estimulatua (SE, *stimulated emission*), egoera kitzikatuaren xurgapena (ESA, *excited state absorption*) eta fotoproduktuen xurgapena (Berera et al., 2009; Kovalenko et al., 1999).

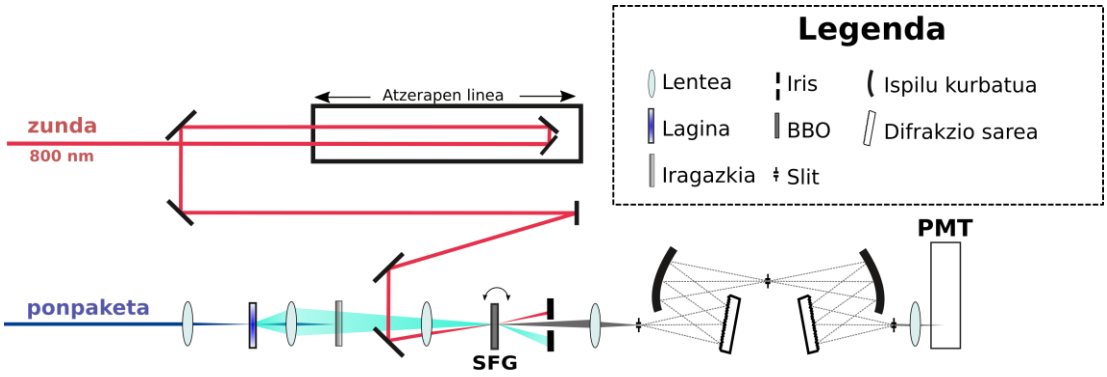
1. irudia. (a) Xurgapen iragankorreko esperimentuetan ematen den ponpaketa-zunda prozesua. (b) TA espektroan eragina duten kontribuzio ezberdinak



2.2 Denboraren araberako fluoreszentzia

Denboraren araberako fluoreszentzia (FuC, ingeleseko *fluorescence upconversion*) teknikaren bitartez disoluzioetan ematen diren prozesu ultraazkarrak (solbatazio dinamikak edota kitzikatutako egoeren erlaxazioa) ikertu daitezke. Teknika honetan, lehenengo eta behin, aztertu nahi den molekularen kitzikatutako egoera ponpaketa deritzon pultsu laser batekin prestatzen da. Ostean, bere igorpen fluoreszentea femtosegundoko bereizmenarekin jarraitzen da. Horretarako, laginaren emisioa bigarren laser pultsu batekin (zunda) kristal ez-lineal batean nahasten da frekuentzien batura (SFG, *sum-frequency generation*) ahalbidetuz. Beraz, zundaren atzerapen-denbora kitzikapenarekiko aldatzen bada, fluoreszentziaren denbora-eboluzioa jarraitzea posiblea da (Kahlow et al., 1988; Chosrowjan et al. 2015).

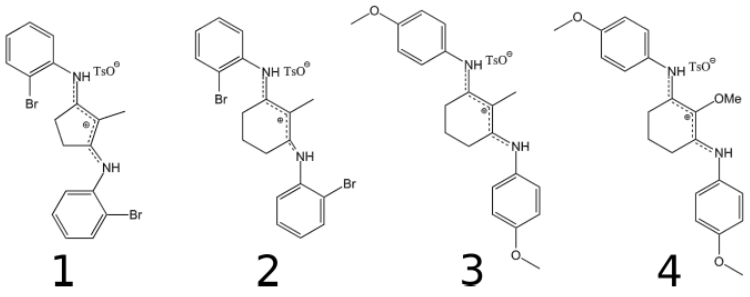
2. irudia. Denboraren araberako fluoreszentzia sistemaren irudi eskematikoa.



3. Ikerketaren muina

Ikerkuntza talde ezberdinek azken urteetan frogatu duten moduan, mikosporina-moduko aminoazido (MAA, *mycosporin-like amino acids*) naturaletan inspiraturik dauden fotobabesleak propietate ezin hobeak erakusten dituzte. Izan ere, kitzikatuak izan ostean modu eraginkor eta ultraazkar batean (ehunka femtosegunduetan) xurgatutako energia barreiatzen baitute barne-aldaketa (IC, *internal conversion*) prozesuaren bidez, molekularen fotoegonkortasuna bermatuz (Woolley et al., 2018). Lan honen helburu nagusia bere egituran bi fenil talde dituzten lau MAA sintetiko ezberdinen (ikusi 3. irudia) dinamika aztertzea eta MAA sinpleek erakusten duten fotofisikarekin alderatzea da. Hau burutzeko, molekulen dinamika esperimentalki TA eta FuC tekniken bitartez aztertu den bitartean, konposatuen energia minimoko lasaikuntza-bideak CASSCF/CASPT2 metodoekin aurreikusi egin dira.

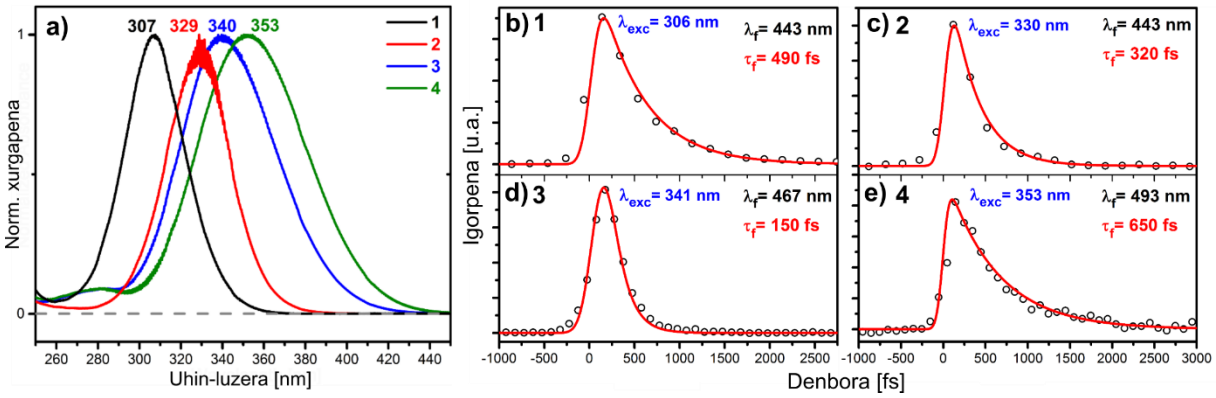
3. irudia. Aztertutako MAA laginen egitura molekularra.



3.1 Denboraren araberako esperimentuen emaitzak

Lehenik eta behin, aztertutako MAA laginak D. Sampedro-ren taldeak (Universidad de La Rioja) sintetizatu dituztela aipatu behar da (Losantos et al. 2017). Denboran ebatzitako esperimentuak burutzeko, molekulak metanoletan (%99.9, Fisher Chemical) 0.7-0.8 mM-ko kontzentraziorekin disolbatu dira. 4a. irudian ikusi daitekeen moduan, 1-4 konposatuen xurgapen maximoak 307 (1), 329 (2), 340 (3) eta 353 nm-tan (4) daude, hurrenez-hurren, eta laginak konbinatuz gero erradiazio UM-B eta UM-A-tik babesteko baliagarriak izan daitezke. Hortaz, denboran ebatzitako esperimentuak burutzeko kitzikapen pultsua lagin bakoitzaren xurgapen maximoaren uhin-luzeran sintonizatu da.

4. irudia. MAA laginen xurgapen espektroa (a) eta burututako FuC neurketak (b-e).



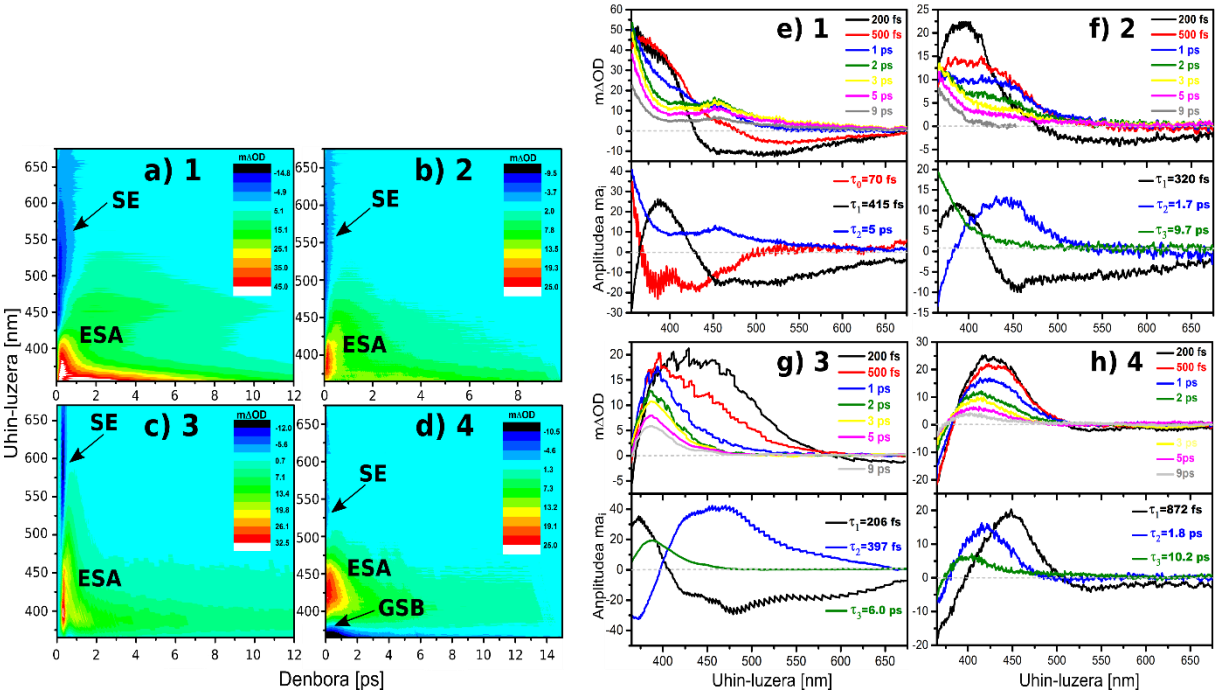
4b-e. irudietan laginen igorpenaren eboluzioa kitzikatuak izan ostean adierazten da. Somatu daitekeen moduan, konposatu guztiek ehunka fs-ko bizitza-denbora baten bitartez fluoreszentea ez den egoera elektroniko batera lasaitzen dira (kasu honetan oinarrizko egoerara).

Behatutakoa konprobatzeko TA esperimentuak burutu dira, zunda modura 350 –tik 700 nm-ra dihoan argi zuria erabiliz, eta 5. irudian ikusi daitekeen moduan, eskuratutako bizitza-denborek lasaikuntza prozesu bera ematen dela berretsi dute. TA espektroak aztertuz gero (5a-d. irudia), molekula guztiek 450-500 nm-ko eskualdean xurgatzen dutela ikusi daiteke eta uhin-luzera handiagotan azkarrago erlaxatzen direla behatu daiteke. Banda honek kitzikatutako egoeraren xurgapena (ESA) eta oinarrizko egoerak pairatzen duen bibrazio-lasaikuntza adierazten digu. Era berean, konposatu guztiek uhin-luzera handietan anplitude negatiboa eta denbora gutxiz bizitzen den banda bat dute, igorpen estimulatua (SE) hain zuzen ere. Azkenik, aipagarria da 4. laginean 350 nm inguruan anplitude negatiboa duen beste banda bat soma daitekeela. Kasu honetan, molekularen oinarrizko egoeraren xurgapenari (GSB) dagokio.

TA espektroek denboran zehar pairatzen dituzten aldaketak hobeto ulertzeko asmoz, doikuntza orokorraren prozedura erabili da (Beckwith et al., 2020). Hori dela eta, eskuratutako trantsitorio guztiak hiru funtzio esponentzialen baturarekin doitu dira, hauek ponpaketa-zunda laser pultsuen korrelazio-gurutzatuarekin konboluzionatuz. Zunda uhin-luzera guztiak aldi berean doitzen direnez, uhin-luzera guztiek bizitza-denbora (τ_i) berdinak aurkezten dituzte, baina euren anplitudea ($Ai(\lambda_{pr})$) ezberdina izango da uhin-luzera bakoitzerako. Horri esker, DAS-ak (*decay associated spectra*, Ai *vs.* λ_{pr}) irudikatzea posiblea da, espektroan eragina duten kontribuzio ezberdinak zeintzuk diren antzematea ahalbidetuz (ikusi 5.e-h irudia).

Hortaz, τ_1 = 200 – 800 fs-ko bizitza-denborak konposatuek S_1 egoerara kitzikatuak izan ostean oinarrizko egoerara lasaitzean pairatzen duten barne-aldaketa prozesua adierazten du, DAS-ean 385 nm-tn anplitude positiboa erakusten duelako, ESA-rekin erlazionatuta baitago, eta, aldiz, 425-tik 700 nm-ra anplitude negatiboa SE prozesuarekin bat egite duelako. Ostera, τ_2 = 0.4 – 1.8 ps eta τ_3 = 6 – 10.2 ps-ko denbora-konstanteek oinarrizko egoerak jasaten duen bibrazio-lasaikuntza jakinarazten digu. Izan ere, 425-550 nm-ko eremuan τ_1 negatiboa den bitartean, τ_2 positiboa da. Horrek espektroaren eremu hau τ_1 konstantearekin eratzen dela eta τ_2-rekin lasaitzen dela adierazten du. Era berean, uhin-luzera txikietan τ_2 negatiboa denean, τ_3 bizitza-denboraren anplitudea positiboa da, oinarrizko egoeraren bibrazio-egoerak erlaxatzen ari baitira, eta, gainera, denbora-konstante hauek ez dira FuC esperimentuetan behatzen.

5. irudia. (a-d) MAA molekulen TA espektroak, (e-h) denbora ezberdinetan behatu daitezkeen espektroak (goian) eta DAS-ak (behean).

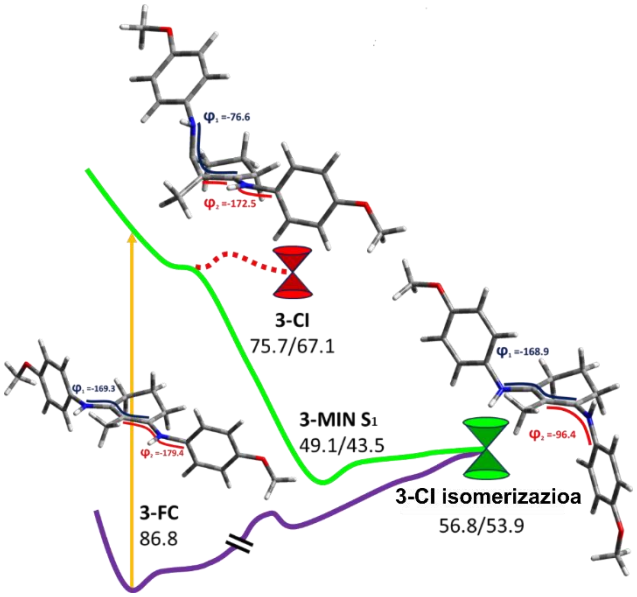


3.2 Kalkulu konputazionalak

Esperimentalki behatutakoa CASSCF/CASPT2 kalkulu konputazionalen bitartez egiaztatu da. Mota honetako kalkuluetan, ezinbestekoa da gune aktibo (*x*,*y*) bat definitzea, hau da, zenbat elektroi (*x*) eta orbital (*y*) erabiliko diren aztertu nahi den sistemaren antolamendu elektronikoa modu egokian deskribatzeko. Orokorrean, biomolekula aromatikoen kasuan, C=C eta C=N loturen π eta π* orbitalak kontuan hartzen dira eta N atomoaren bikote bakartia.

MAA molekulen energia minimoko lasaikuntza-bideak kalkulatzeko (14,13) edo (6,5) gune aktiboak erabili dira, fenilo eraztunaren kontribuzioa kontuan hartzen den ala ez arabera. Aurreikusitako energia minimoko bideen arabera (ikusi 6. irudia), aztertutako konposatu guztiek lasaikuntza-bide berdina erakusten dute: Ponpaketa pultsuak ππ* izaera duen S_1 egoera kitzikatua prestatzen du eta, ostean, populazioak C=N isomerizazio koordenatuan oinarrizko egoerara erlaxatzen dira iritsi-erraz den S_1/S_0 ebakidura koniko bati esker (berdez 6. irudian). Fenilo talderik ez dituzten MAA sinpleekin konparatuta, aztertutako molekuletan ez da planoz-kanpoko deformaziorik gertatzen (Woolley et al., 2018) eta, ondorioz, koordenatu honetan espero daitekeen ebakidura konikora (gorriz 6. irudian) heltzea ez da posible. Beraz, aztertutako MAA laginetan oinarrizko egoerara lasaitzeko bide berri bat, C=N loturaren isomerizazioan oinarritzen dena, aurkitu dela baieztatu daiteke.

6. irudia. Energia minimoko lasaikuntza-bideak 3. molekularentzat. Egoera kitzikatuaren minimoen energia balioak kcal mol^{-1}-tan agertzen dira oinarrizko egoeraren minimoarekiko (86.8 kcal mol^{-1}). Bi zenbaki agertzen direnean, lehenengoaren balioak S_1-ren energia adierazten du eta bigarrenak, ostera, oinarrizko egoerarena geometria horretan.



4. Ondorioak

Mikosporina-moduko aminoazido (MAA) naturaletan inspiraturik dauden lau fotobabesle sintetikoen fotofisika aztertu egin da TA eta FuC tekniken bidez. Konposatuen energia minimoko lasaikuntza-bideak CASSCF/CASPT2 metodoekin kalkulatu dira. Burututako denboran-ebatzitako esperimentu eta kalkuluetan oinarrituta, konposatu hauen lasaikuntza zelan gertatzen den ulertzea lortu egin da. Erradiazio UMaren bitartez S_1 ($\pi\pi^*$) egoera kitzikatu eta gero, populazioak C=N isomerizazio koordenaturen bidez erlaxatzen da τ_1 = 200 – 800 fs-tan (τ_0 = 70 fs lehenengo laginaren kasuan). Horrela, molekulak oinarrizko egoerara lasaitzen dira eskuragarri dagoen S_1/S_0 ebakidura konikoaren bitartez. Ondoren, τ_2 = 0.4 – 1.8 ps (τ_1 = 415 fs lehengo laginarentzat) eta τ_3 = 6 – 10.2 ps (τ_2 = 5 ps lehenengo laginarentzat) balio tarteak dituzten bizitza-denborak TA espektroskopiaren bidez determinatu dira, oinarrizko egoeraren bibrazio-lasaikuntza adierazten dituztenak. Ondorioz, konposatu hauetan bi fenil talde egoteak C=N isomerizazioaren lasaikuntza-bidea ahalbidetzen du, beste MAA sinpleetan ikusi den planoz-kanpoko deformazio bidea galaraziz. Lan honi esker aztertutako konposatuek fotobasbesle izateko propietate egokiak dituztela frogatu egin da.

5. Etorkizunerako planteatzen den norabidea

MAA-moduko egitura duten fotobabesle hauen dinamika aztertzerakoan, C=N isomerizazioan oinarritutako lasaikuntza-mekanismo berri bat behatzea lortu egin da. Zentzu honetan, oraindik ikerketa lan handia egin behar dela argi dago, bereziki ordezkatzaile ezberdinek konposatu hauen fotofisikan duten eragina zein den zehazteko. Beraz, molekula hauen erlaxazioa disolbatzaile ezberdinetan eta, posiblea bada, gas-egoeran aztertzea izango da gure hurrengo urratsa. Espero dugu, Sampedro Irakaslearekin dugun kolaborazioari esker, sistema hauen fotoegonkortasuna baimentzen dituzten mekanismoak sakonki ikertzea, etorkizuneko UM fotobabesleen belaunaldi berriaren diseinua ahalbidetzeko.

6. Erreferentziak

Abiola, T. T., Whittock, A. L., Stavros, V. G. (2020): “Unravelling the Photoprotective Mechanisms of Nature-Inspired Ultraviolet Filters Using Ultrafast Spectroscopy”. *Molecules* **2020,** *25* (17), 3945.

Baker, L. A., Marchetti, B., Karsili, T. N., Stavros, V. G., Ashfold, M. N. (2017): "Photoprotection: extending lessons learned from studying natural sunscreens to the design of artificial sunscreen constituents. *Chemical Society Reviews*, 46 (12), 3770-3791.

Beckwith, J. S., Rumble, C. A., Vauthey, E. (2020): "Data analysis in transient electronic spectroscopy – an experimentalist's view". *International Reviews in Physical Chemistry*, 39 (2), 135-216.

Berera, R., van Grondelle, R., Kennis, J. T. M. (2009): "Ultrafast transient absorption spectroscopy: principles and application to photosynthetic systems". *Photosynthesis Research*, 101 (2), 105-118.

Bradler, M., Baum, P., Riedle, E. (2009): "Femtosecond continuum generation in bulk laser host materials with sub-μJ pump pulses". *Applied Physics B*, 97 (3), 561.

Chosrowjan, H., Taniguchi, S., Tanaka, F. (2015): "Ultrafast fluorescence upconversion technique and its applications to proteins". *The FEBS journal*, 282 (16), 3003-3015.

Dahle, J., Kvam, E. (2003): "Induction of Delayed Mutations and Chromosomal Instability in Fibroblasts after UVA-, UVB-, and X-Radiation". *Cancer Research*, 63 (7), 1464.

Heurung, A. R., Raju, S. I., Warshaw, E. M. (2014): "Benzophenones". *Dermatitis*, 25 (1), 3-10.

Kahlow, M. A., Jarzęba, W. o., DuBruil, T. P., Barbara, P. F. (1988): "Ultrafast emission spectroscopy in the ultraviolet by time-gated upconversion". *Review of scientific instruments*, 59 (7), 1098-1109.

Kovalenko, S. A., Dobryakov, A. L., Ruthmann, J., Ernsting, N. P. (1999): "Femtosecond spectroscopy of condensed phases with chirped supercontinuum probing". *Physical Review A*, 59 (3), 2369-2384.

Losantos, R., Funes-Ardoiz, I., Aguilera, J., Herrera-Ceballos, E., García-Iriepa, C., Campos, P. J., Sampedro, D. (2017): "Rational design and synthesis of efficient sunscreens to boost the solar protection factor". *Angewandte Chemie*, 129 (10), 2676-2679.

Rodrigues, N. D. N., Staniforth, M., Stavros, V. G. (2016): "Photophysics of sunscreen molecules in the gas phase: a stepwise approach towards understanding and developing next-generation sunscreens". *Proceedings of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, 472 (2195), 20160677.

Sinha, R. P., Häder, D.P. (2002): "UV-induced DNA damage and repair: a review". *Photochemical & Photobiological Sciences*, 1 (4), 225-236.

Woolley, J. M., Staniforth, M., Horbury, M. D., Richings, G. W., Wills, M., Stavros, V. G.(2018): "Unravelling the Photoprotection Properties of Mycosporine Amino Acid Motifs". *The Journal of Physical Chemistry Letters*, 9 (11), 3043-3048.

7. Eskerrak eta oharrak

Burututako esperimentuak Espainiako MINECO-k emandako diru-laguntzari (PGC2018-098561-B-C21 proiektua) esker gauzatu dira. Era berean, Eusko Jaurlaritzaren diru-laguntzak (IT1162-19 and IT1491-22) ere eskertzen dira. I. Lamasek eta M. Parrak UPV/EHUri eskertzen diote bere doktoregai beka. A.Camiruagak Eusko Jaurlaritzari eskertzen dio bere doktoregai beka. Eskerrak ere UPV/EHUko SGIker Laser zerbitzuari, hor gauzatu baitira aurkeztutako neurketa esperimentalak eta D. Sampedrori (Universidad de La Rioja) neurtutako laginak sintetizatzeagatik eta burututako kalkulu konputazionalengatik.

Geoffroy saguzarraren dieta Euskal Herrian

Nerea Vallejo, Joxerra Aihartza, Lander Olasagasti, Miren Aldasoro, Urtzi Goiti, Inazio Garin

Jokabidearen ekologia eta eboluzioa taldea, Zoologia eta Animalia Zelulen Biologia Saila, Zientzia eta Teknologia Fakultatea, EHU. Sarriena z.g. Leioa, Bizkaiko kanpusa.
nerea.vallejo@ehu.eus

Laburpena

Geoffroy saguzarrak eguneko euliak eta armiarmak ditu gustuko, baina harrapakin talde bakoitzaren garrantzia eremu geografikoarekin aldatzen da. Lan honetan, Euskal Herriko eta inguruetako hamaika kolonia aukeratu ditugu, eta "DNA Metabarcoding" teknikaren bidez haien dieta aztertu dugu bi garai ezberdinetan, dietan aldakortasun tenporal eta espaziala aztertzeko. Oro har, armiarma eta euli ugariko dieta aurkezten dute ikertutako koloniek. Koloniaren inguruko paisaiaren ezaugarriek eragin handiago dute dietan uztailean, eta abeltzaintza aktibitatea altuagoa den eremuetan dipteroen, zehazki *Stomoxys calcitrans* euliaren, kontsumo handiagoa topatu dugu. Beraz, Euskal Herrian Geoffroy saguzarraren kontserbaziorako ezinbestekoa da bi harrapakin mota hauen eskuragarritasuna bermatzea.

Hitz gakoak: *Myotis emarginatus*, dieta tenporala, euliak, armiarmak, DNA Metabarcoding.

Abstract

The notch-eared bat is fond of diurnal flies and spiders, but the importance of each prey type varies according to geographic location. In this study, we chose eleven colonies in the Basque Country and its surroundings, and we analyzed their diet using DNA metabarcoding throughout the whole maternity season, with the aim of studying the spatio-temporal variability of the diet. Overall, the notch-eared bat presents a diet rich in both spiders and diurnal flies in the colonies studied. In July, a greater consumption of the fly Stomoxys calcitrans *can be expected in the colonies where livestock farming is more important. This indicates that ensuring availability of these two types of prey species is essential for the conservation of the notch-eared bat in the Basque Country.*

Keywords: Myotis emarginatus, seasonal diet, prey, flies, spiders, DNA Metabarcoding

1. Sarrera eta motibazioa

Saguzar intsektiboroen dieta sakon ikasia izan da XXI. mendean (Tawesuub et al., 2021). Ikerketa mota hauek berebiziko garrantzia duen oinarrizko informazioa ematen digute ikerlarioi gure inguruko espezieen ekologiaren inguruan (adib. Arrizabalaga-Escudero et al., 2019), eta prozesu ekologikoetan duten paperaren inguruan, adibidez, izurriteen supresioan (Baroja et al., 2019). Horrez gain, kontserbazio plan espezifikoak diseinatzeko ezinbestekoa den informazioa sortzen dute.

Saguzar intsektiboroak harrapakin mota ugariz elikatzen dira. Espezie bakoitzaren hegakerak eta ekokokapenaren ezaugarriek zein harrapakin detektatu eta ehizatzeko gai den (Siemers eta Swift, 2006), eta zein habitat motetan ehizatzeko gai den definitzen dute (Starik et al., 2021). Horrez gain, banakoaren sexuak (Mata et al., 2016), adinak (Arrizabalaga-Escudero et al., 2019), beste harrapari batzuen presentziak (Razgour et al., 2011) edota harrapakinen eskuragarritasunarekin erlazionatutako faktore espazio-tenporalek (Goiti et al., 2008) eragina dute saguzarren dietaren konposizioan.

Euskal Herrian, Geoffroy saguzarra (*Myotis emarginatus*) espezie arrunta da. Izaera harpetarra du, baina maiz baserrietako ganbaratan, bordatan geldi dauden detektatu eta ehizatzeko gaitasuna du (Dietz eta Pir, 2021).

Espezie arrunta den arren, Euskal Herriko populazio ezberdinen dieta eta elikatzeko modua ez da espresuki ikertu orain arte. Euskal Autonomia Erkidegoko espezie mehatxatuen katalogoan "Kaltebera" kategorian sailkaturik dago, eta Nafarroko katalogoan, aldiz, "Zaurgarri" kategorian. Europn hainbat legek babesten dute baita ere. Ondorioz, gure eremuan bere ekologia trofikoa ikertzea ezinbestekoa da espeziearen biziraupena bermatuko dituzten neurriak hartzeko.

2. Arloko egoera eta ikerketaren helburuak

Bere dietaren aukeraketari dagokiola, jokamolde berezia aurkezten du, ia espresuki armiarmez eta eguneko euliez elikatzen delako. 1980. urtetik 2010. urteraino Geoffroy saguzarraren inguruko ikerketa gehienak bere banaketaren iparraldeko mugan gauzatu ziren. Bertan, bere bi harrapakin mota gustukoenen arteko dieta nahiko orekatua aurkezten du (Beck, 2012; Steck eta Brinkmann, 2006). Irrati telemetriaz egindako lanek adierazten dutenez, baso hostoerorkorretan eta behi-ukuiluetan ehizatzen du batez ere (Dekker et al., 2013; Krull et al., 1991). Ukuiluekiko daukan zaletasunak ere bere iparralderako hedapenean garrantzia izan duela uste da, bertan euliak ugariak direlako eguraldia horren ona ez denean ere (Dietz eta Pir, 2021). Bere jatorrizko eremuan, Mediterraneo itsasoaren inguruan alegia, basoak erabiltzen ditu ehizarako (Flaquer et al., 2008; Goiti et al., 2011). Leku hauetan, armiarmak dira bere dietaren elementu nagusia (Goiti et al., 2011).

Euskal Herrian, bi kolonien dieta aztertu zuten Vallejo et al.-ek (2019), iberiar penintsulako beste kolonia batzuekin batera. Lehen aldiz teknika molekularrak erabiliz, harrapakinak espezie mailaraino identifikatu zituzten. Emaitzek Geoffroy saguzarraren armiarma amaraungileekiko zaletasuna berretsi zuten, baina Euskal Herriko kolonietan dieta aldakorragoa somatu zuten.

Ikerketa honetan Geoffroy saguzarraren dieta aztertu dugu Euskal Herriko hamaika kolonia ezberdinetan, goian aipatutako bi koloniak barne hartuta. Hurrengo galderak erantzutea dugu helburu nagusia:

1) Zer nolakoa da Geoffroy saguzarraren dieta Euskal Herrian?
2) Ezberdintasun nabariak daude dietaren aldakortasunean garaiaren arabera?
3) Koloniaren inguruko paisaiaren ezaugarriek eta abeltzaintza aktibitateak eragina du Geoffroy saguzarraren dietan?

3. Ikerketaren muina

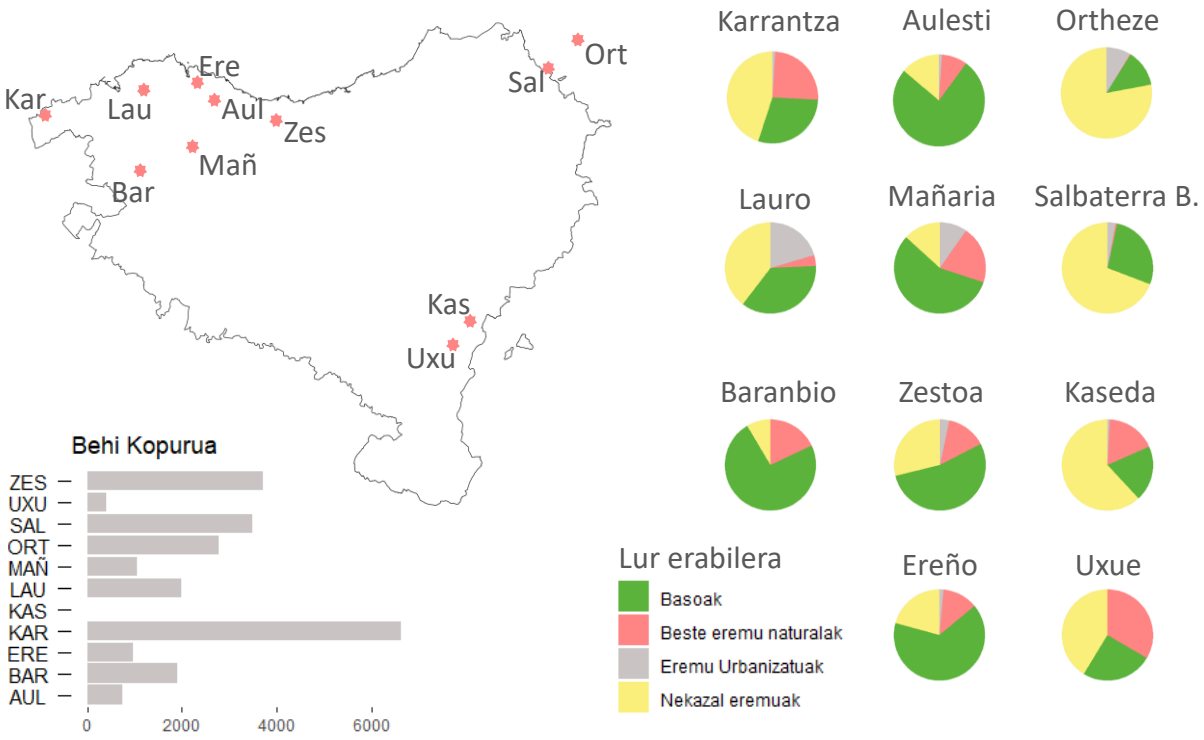
3.1 Kolonien aukeraketa eta deskribapena

Laginketak 2012 eta 2020 urteetan gauzatu genituen, Euskal Herriko hamaika kolonia ezberdinetan (1. irudia). Kolonia bakoitzerako inguruko 5 kilometroko erradio batean paisaiaren eta nekazal aktibitatearen inguruko informazioa bildu genuen. Bost kilometroko erradioko distantzia aukeratu genuen Geoffroy saguzarraren ehiza eremu gehienak distantzia honetara daudelako haien gordelekuetatik (Dietz eta Pir, 2021). Lur erabileraren inguruko datuak 2018. urteko *Corine Land Cover* proiektua erabiliz lortu genituen. Bertan deskribatutako kategoriak lau motatako lur erabileretan taldekatu genituen: basoak, nekazal eremuak, eremu urbanoak eta beste eremu naturalak. Bestalde, kolonien inguruko udalerri bakoitzean erroldatutako behi kopurua ere lortu genuen.

3.2 Laginen lortzea eta analisia

Kolonia bakoitzean saguzarren gorotzak jaso genituen bi sasoi ezberdinetan, maiatzean eta uztailean. 2012. urtean Karrantza Haraneko eta Aulestiko koloniak lagindu genituen. Laginak lortzeko saguzarrak harpa-sarez harrapatu genituen koloniaren sarreran, goizean goiz gordelekura bueltatzen ari zirela. Saguzarrak ordubetez oihalezko poltsatan mantendu genituen gorotza egin zuten arte. Gainerako koloniak 2022. urtean lagindu genituen. Gure inpaktua txikitzeko, laginak zuzenean koloniaren azpitik jaso genituen. Gorotzak berriak zirela bermatzeko saguzarren azpian paper zati bat jarri genuen, eta bi egunen buruan laginak batu genituen. Lagin guztiak izoztuta gorde genituen jaso eta 6 orduren buruan, gehienez jota.

1. irudia. Kolonien kokapena Euskal Herriko mapan (Goian ezkerrean). Kolonia bakoitzaren inguruan erroldatutako behi kopurua 5 kilometroko erradioan (Behean ezkerrean). Kolonia bakoitzaren inguruko lur erabilera adierazten duten grafikoak 5 kilometroko erradioan (Eskuinean).



Dietaren analisia burutzeko bildutako lagin bakoitzaren gorotzen DNA erauzi genuen DNeasy Power Soil kita erabiliz (Qiagen). Ondoren, DNA anplifikatu genuen PCR teknikaren bitartez, harrapakin talde ugari eta baita saguzarra anplifikatzeko ahalmena duten hasleak erabiliz (Gillet et al., 2015; Vamos et al., 2017). Azkenik, errendimendu handiko sekuentziazioa erabiliz, lagin bakoitzeko milaka DNA sekuentzia irakurri genituen. Lortutako sekuentzia gordinak bioinformatikoki prozesatu genituen sekuentziazio prozesuan gerta daitezkeen akatsak ahalik eta gehien garbitzeko. Sekuentziak harrapakin espezieekin esleitzeko, antzeko sekuentziak erabiliz OTUak (Operational Taxonomic Unit) eraiki genituen. OTU hauek GenBank eta BoldSystems online datu baseekin erkatu genituen bakoitzaren identifikazio taxonomikoa lortzeko espezie mailan.

Aukeratutako hasleek saguzarren DNA anplifikatzeko aukera ematen dutenez, kolonien azpian bildutako laginak Geoffroy saguzarrarenak zirela konprobatu genuen. Gure kasuan, pausu hau garrantzitsua da Geoffroy saguzarrak maiz ferra saguzarrekin batera eratzen dituelako kumatze koloniak. Pausu honen ostean, eta dietaren garbiketaren ostean, kolonia eta data bakoitzean lortutako lagin kopurua 1. taulan azaltzen da.

3.3 Dietaren konposizio eta aldakortasuna

Kolonia eta laginketa egun bakoitzaren dietaren konposizioa adierazteko, taxoi bakoitzaren agerpen ehuneko zamatua (AEZ, (Deagle et al., 2018) kalkulatu genuen, bai genero mailan, eta bai orden mailan. Espezie mailako informazioa izan arren, analisi estatistikoak egiteko genero eta orden maila aukeratu genituen, bi maila taxonomiko hauek informazio ekologiko esanguratsua ematen dutelako, eta espezie mailako analisiak baino sinpleagoak direlako. Hala ere, biologikoki aproposa denean beste maila taxonomiko batzuk ere erabiliko ditugu.

Kolonia guztiak kontutan hartuta, orden mailan dieta nahiko antzekoa da lagindutako bi sasoietan. Armiarmen kontsumoa %48koa da maiatzean, eta %57raino igotzen da uztailean (2. irudia). Maiatzean gehien kontsumitutako armiarmak *Metellina* (%11) eta *Nuctenea* (%9)

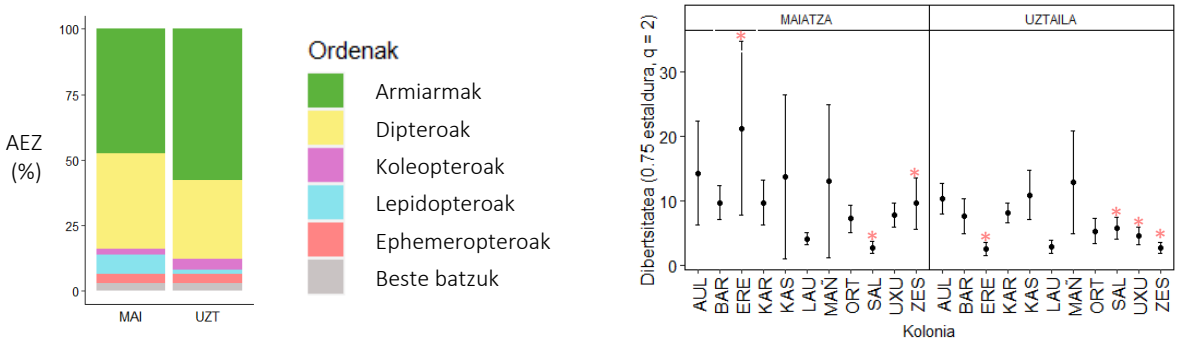
generokoak dira. Uztailean ordea, kontsumitutako armiarma gehienak *Araneus* generokoak dira (%34). Hiru genero hauek armiarma amaraungileak dira. Dipteroen kontsumoa, ordea, txikitu egiten da maiatzetik (%36) uztailera (%30) (2. irudia). *Stomoxys calcitrans* eguneko euliaren kontsumoak dieta totalaren %12-14 suposatzen du bi garaietan, eta *Musca* generoko eulien kasuan %8-4koa da.

1. taula. Kolonia eta sasoi bakoitzean lortutako lagin kopurua.

	Maiatza	Uztaila		Maiatza	Uztaila
Karrantza	7	29	Zestoa	11	8
Lauro	8	8	Ortheze	17	8
Baranbio	14	12	Salbaterra B.	6	8
Ereño	7	19	Kaseda	6	8
Aulesti	7	28	Uxue	9	8
Mañaria	4	6			

Dietaren dibertsitatea kalkulatzeko bigarren mailako Hill zenbakiak erabili genituen, dietan ugariagoak diren taxoiei pisu handiagoa emateko (Chao et al., 2014). Horrez gain, kolonien eta daten arteko konparaketa egokiak egiteko, dibertsitate balioak estimatutako dibertsitate osoaren %75eko baliora estrapolatu genituen R programarentzako iNEXT paketea erabiliz. Kolonia ezberdinak estaldura balio berera estrapolatzea garrantzitsua da laginketa desorekatuetan konparazio fidagarriak egin ahal izateko (Chao et al., 2014). Bi kolonia edo daten artean ezberdintasun esanguratsuak daudela onartu dugu estrapolazioaren konfiantza tarteak gainezartzeen ez direnean (2. irudia).

2. irudia. Orden mailako dietaren konposizioa aztertutako hamaika kolonietan (Ezkerrean). Genero mailako dietaren dibertsitatearen estimazioa, estaldura maila berera estrapolatuta kolonia eta daten artean konparagarria izan dadin. Izartxoak kolonia beraren arteko ezberdintasun esanguratsuak adierazten ditu bi laginketa daten artean (Eskuinean).



Orokorrean, kolonia guztietan dibertsitatea baxuagoa da uztailean maiatzean baino, ezberdintasuna esanguratsua izanik Ereñon, Uxuen eta Zestoan. Hiru kasuetan uztailean armiarmen kontsumoa gailendu egiten da beste harrapakin mota batzuen gainetik, dibertsitatearen galerarekin lotuta dagoena: Zestoan %21etik %66ra, Ereñon %42tik %85era eta Uxuen %58tik %93ra. Gainerako kolonietan antzeko joera ikusten dugu, dibertsitatean aldaera esanguratsurik ikusi ez arren, Aulesti eta Karrantzan salbu. Harrapakin generalista ugarik haien harrapakinak aukeratzeko orduan izaera zabalagoa erakusten dute jana urria denean, eta gustuko harrapakin motan zentratzen dira jana orokorrean ugaria denean (Emlen, 1966). Gure kasuan, harrapakinen ugaritasun baxuagoa espero dezakegu maiatzean uztailean baino. Gure aurreikuspena kolonia guztietan betetzen da, Salbaterra Bearnoko kolonian salbu (2. irudia). Uztailean, tenperatura epelagoei esker hainbat intsektu fase hegalarian aurkitzen ditugu (Hails

1982). Armiarmak urte osoan zehar topatzen ditugu gure basoetan, espezieek fenologia ezberdinak aurkezten dituztelako. Hala ere, *Araneus* generoko espezie ugari uztailetik aurrera heltzen dira (Olive, 1981), eta beraz udaren amaieran eskuragarriago egongo dira Geoffroy saguzarrarentzako.

Karrantzan eta Aulestin armiarma amaraungileak ez diren beste espezie batzuk gailentzen dira udan. Karrantzan dipteroen kontsumoa igo egiten da (maiatza %17, uztaila %67), eta armiarmena jaitsi egiten da (maiatza %74, uztaila %20). Aulestin armiarmen kontsumoa jaitsi egiten da baita ere (maiatza %63, uztaila %28) eta dipteroena igo (maiatza %23, uztaila %34), eta horrez gain koleopteroen kontsumo altua ikusten dugu uztailean (%25). Honek, Geoffroy saguzarraren moldapen gaitasuna, eta lokalki probetxuzkoak diren harrapakin iturrien ezagutza eta ustiapen gaitasuna aditzera ematen du.

3.4 Paisaiaren eragina dietaren konposizioan

Paisaiak dietan izan dezakeen eragina aztertzeko distantzia matrizeetan oinarritutako erredundantzia analisietara jo genuen (db-RDA). Analisi honek dieta matrize osoa erabili dezake, eta laginen arteko distantzia matrize batean oinarrituta, dietaren konposizioa gure intereseko hainbat aldagairekin erlazionatzen ditu. Gure kasuan, kolonien inguruko lur erabileraren eta abeltzaintza errolden datuak erabili genituen azalpen-aldagai gisa. Azalpen aldagaien arteko kolinearitatea ekiditeko, “nekazal eremuak” aldagaia kanpoan utzi genuen, “basoak” aldagaiarekin negatiboki korrelazionatuta zegoelako. db-RDAk eraiki ondoren, R programan *stepAIC* funtzioa erabili genuen modeloak sinplifikatzeko eta garrantzizkoak ez diren aldagaiak modeloetatik kanpo utzi genituen. db-RDA modeloen emaitzak ordenazio grafikoen bidez adierazi ditugu (3. irudia).

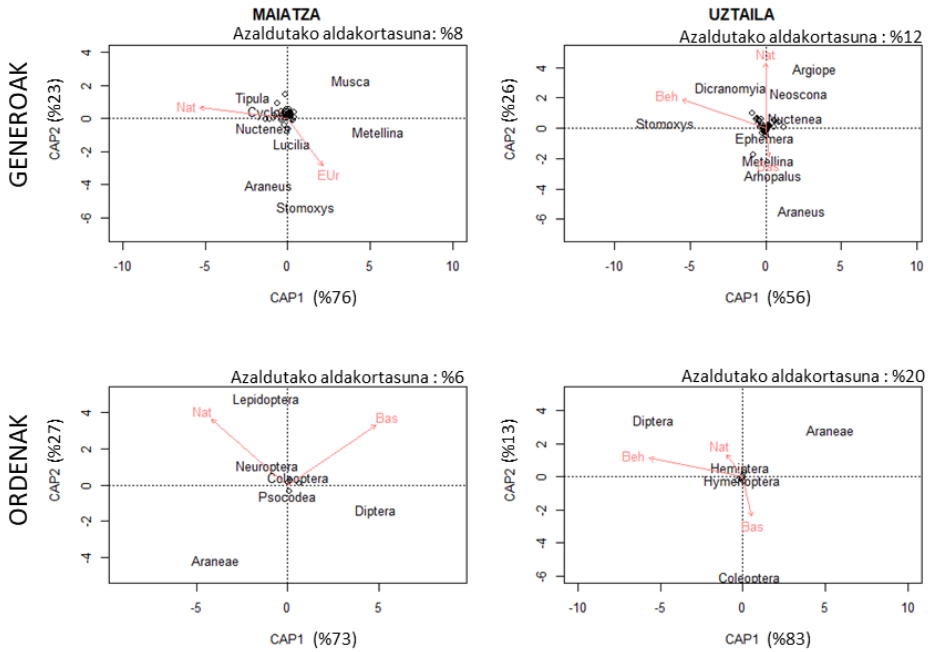
db-RDA modeloen emaitzek aditzera ematen dutenez, koloniaren inguruko paisaiak gutxiago baldintzatzen du Geoffroy saguzarraren dieta maiatzean uztailean baino (3. irudia, azaldutako aldakortasuna). Maiatzean koloniaren inguruko abeltzaintza aktibitateak ez du eragin esanguratsurik Geoffroy saguzarraren dietan. Uztailean, ordea, abeltzaintza aktibitatea (3. irudiko grafikoetan “Beh” gisa adierazita) oso erlazionatuta dago db-RDAren lehenengo ardatzarekin. Beraz, uztailean, kolonien arteko dietaren aldakortasunean garrantzi handiena duen faktorea da. Abeltzaintza aktibitate ugaria duten kolonietan (1. irudia), dipteroen kontsumo altuagoa eta armiarmen kontsumo baxuagoa espero dezakegu (3. irudia). Bereziki, *Stomoxys* generoko eulien kontsumo altua espero dezakegu. Europan, *Stomoxys calcitrans* da genero honetako espezie bakarra. Ugaria da ukuiluetan eta ganaduaren artean, batez ere eredu tradizionaleko abeltzaintza eremuetan (Dietz eta Pir., 2021); gainera, bere ziztadek abereen osasuna kaltetu dezakete eta hainbat gaixotasun transmititu (González, 2022).

S. calcitrans ez da Geoffroy saguzarrak ugari kontsumitu duen izurrite bakarra. Uztailean, *Arhopalus* generoko koleopteroen kontsumo altua ikusten dugu Aulestiko kolonian. db-RDAk argi azaltzen duenez, basoen presentziarekin erlazionatutako harrapakina da. *Arhopalus* generoko koleopteroak konifero basoetan dira ugariak, eta larba fasean zuhaitzen enborretan galeriak sortzen dituzte, eta beraz zuhaitzak kaltetzeko ahalmena du. Europan izurrite bilakatzen ez den arren, *Bursaphelenchus xylophilus*m nematodo arriskutsuaren bektore izan daiteke (Boone et al., 2015).

Uztailean, armiarmen kontsumoa nolabait negatiboki erlazionatuta dago abeltzaintza aktibitatearekin, orden mailako db-RDA grafikoan ikusten denez (3. irudia). Hala ere, ez dago argi paisaiaren beste ezaugarrirekin erlazionatuta dagoen ala ez. Genero mailako grafikoak informazio gehiago ematen digu, ordea, eta paisaiaren arabera kontsumitutako armiarma generoak ezberdinak direla adierazten digu. Alegia, batez ere basoz inguratutako kolonietan *Araneus* eta *Metellina* generoko armiarmak ugariagoak izango dira, esaterako Baranbion, Ereñon edo Mañarian. Beste motatako eremu naturalak ugariagoak badira, ordea, *Argiope* eta *Neoscona* generoko armiarmak topatuko ditugu maizago Geoffroy saguzarraren dietan, adibidez Uxuen (3. irudia). Landaredi konplexuko leku naturalak oro har egokiak dira armiarma amaraungileen garapenerako, sareak

eraikitzeko aukera ugari aurkezten dituztelako (Rubio eta Moreno, 2010). Basoen eta eremu naturalen presentzia, beraz, garrantzitsua da Euskal Herriko Geoffroy saguzarren kolonientzako, bertan armiarma amaraungileak ehizatzen dituztelako.

3. irudia. Kolonien ezaugarriak eta dietaren elementu ezberdinak erlazionatzen dituzten ordenazio grafikoak. Maiatzeko datuak ezkerraldean agertzen dira, eta uztaileko datuak eskuinaldean. Goian, genero mailako emaitzak daude, eta behean orden mailakoak. Grafiko bakoitzaren gainean azaldutako aldakortasunaren ehunekoa adierazten da. Hau da, modeloan gehitutako koloniaren ezaugarriek dietaren zein ehukeko baldintzatzen duten zuzenean. Ardatz bakoitzaren ondoan, azaldutako ehunekoaren ze proportzio adierazten duten azaltzen da. Taxoiak beltzez idatzita agertzen dira bi ardatzetako grafikoan, eta kolonien ezaugarriak gorriz (Bas: basoak, Beh: behi kopurua, Nat: beste eremu naturalak, EUr: eremu urbanoak)



4. Ondorioak

1) Euskal Herrian, Geoffroy saguzarrak dieta dibertsoa du, hainbat harrapakin ordenez eta generoz osatua. Hala ere, gehien kontsumitutako harrapakinak armiarma amaraungileak, eta eguneko euliak (*Stomoxys calcitrans* eta *Musca sp.*) dira.

2) Kolonia gehienetan dieta aldakorragoa da kumatze sasoiaren hasieran. Honek seguruenik harrapakin eskuragarritasunari erantzuten dio, hainbat saguzar intsektiborok dieta dibertsoagoa erakusten dutelako harrapakin eskuragarritasuna baxuagoa denean, eta haien gustuko harrapakinetan zentratzen dira jana ugariagoa bihurtzen denean.

3) Koloniaren inguruko paisaiak eragin handiagoa du uztaileko dietan. Abeltzaintza aktibitate ugariko kolonietan *Stomoxys* generoko dipteroen kontsumo altuagoa espero dezakegu, eta armiarmen kontsumo baxuagoa. Horrez gain, kontsumitutako armiarma espezieak ezberdinak izango dira koloniaren inguruan basoak edo beste motatako eremu naturalak ugariagoak izan.

4) Euskal Herriko Geoffroy saguzarraren biziraupena bermatzeko garrantzitsua da bere bi harrapakin mota garrantzitsuenen eskuragarritasuna bermatzea kolonien inguruan. Alde batetik, abeltzaintza kudeaketa tradizionalak mantenduz eta pestiziden erabilera mugatuz, eta bestetik basoak eta landaredi konplexuko beste motatako habitatak mantenduz.

5. Etorkizunerako planteatzen den norabidea

Geoffroy saguzarraren ekologia trofikoaren ikerketaren inguruan aztertu gabeko hainbat ideia daude oraindik. Alde batetik, interesgarria litzateke Euskal Herrian abeltzaintzarekin duen lotura espresuki aztertzea, irrati telemetria bidez saguzarrak jarraituz ukuiluek ehiza eremu gisa duten garrantzia kuantifikatzeko, eta beste teknika mota batzuk erabiliz (qPCR teknika espezifikoak esaterako) eulien kontsumoaren datu zehatzagoak lotzeko. Modu honetan, Geoffroy saguzarrak eragindako harraparitza presioak ukuiluetako eulien populazioetan eragina duen jakin ahalko genuke, eta saguzarrek eskaintzen dizkiguten zerbitzu ekosistemikoak kuantifikatu ahal izango genuke.

Bestalde, armiarma amaraungileen kontsumoa ohikoa ez denez saguzarren artean, interakzio hau zehatzago ikastea ere interesekoa litzateke. Lan honetan aurkeztu dugunez, armiarma espezie ezberdinak kontsumitzen dituzte lekuaren eta urte sasoiaren arabera. Ezberdintasun hauek momentuko armiarma komunitatearen egitura islatzen duten, edo saguzarraren partetik nolabaiteko hautaketa dagoen jakitea interesgarria litzateke.

6. Erreferentziak

Aihartza, J.R. (2001) Araba, Bizkaia eta Gipuzkoako Kiropteroak: Banaketa, Ekologia eta Kontserbazioa. Tesia, Universidad del País Vasco-Euskal Herriko Unibertsitatea.

Arrizabalaga-Escudero, A., Merckx, T., García-Baquero, G., Wahlberg, N., Aizpurua, O., Garin, I., Goiti, U., & Aihartza, J. (2019) Trait-based functional dietary analysis provides a better insight into the foraging ecology of bats. *J Anim Ecol*, 88, 1587–1600. https://doi.org/10.1111/1365-2656.13055

Baroja, U., Garin, I., Aihartza, J., Arrizabalaga-Escudero, A., Vallejo, N., Aldasoro, M., & Goiti, U. (2019) Pest consumption in a vineyard system by the lesser horseshoe bat (Rhinolophus hipposideros). *PLoS ONE*, 14(7), e0219265. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0219265

Beck, A. (1995) Fecal analyses of European bat species. *Myotis*, 32, 109–119

Boone, C.K., Grégoire, J.C., & Drumont, A. (2015). Cerambycidae attracter do seiochemicals used as lures for *Monochamus* spp. In the Sonian Forest, Brussels-Capital Region, Belgium (Insecta: Coleoptera). *Bulletin de la Société royale belge d'Entomologie*, *151*, 122-133

Chao, A., Gotelli, N.J., Hsieh, T.C., Sander, E.L., Ma, K.H., Colwell, R.K., & Ellison, A.M. (2014) Rarefaction and extrapolation with Hill numbers: a framework for sampling and estimation in species diversity studies. *Ecol Monog*, 84, 45-67. https://doi.org/10.1890/13-0133.1

Deagle, B.E., Thomas, A.C., McInnes, J.C., Clarke, L.J., Vesterinen, E.J., Clare, E.L., Kartzinel, T.R., Eveson, J.P. (2018) Counting with DNA in metabarcoding studies: How should we convert sequence reads to dietary data? *Mol Ecol* 28, 391–406. https://doi.org/10.1111/mec.14734

Dekker, J.J., Regelink, J.R., Jansen, E.A., Brinkmann, R., & Limpens, H.J. (2013) Habitat use by *Myotis emarginatus*. *Lutra*, 56, 111–120

Dietz, M., & Pir, J.B. (2021). Geoffroy's Bat Myotis emarginatus (Geoffroy, 1806). In: Hackländer, K., Zachos, F.E. (eds) *Handbook of the Mammals of Europe*. Springer Nature, Cham., Switzerland. https://doi.org/10.1007/978-3-319-65038-8_56-1

Emlen, J.M. (1966) The role of time and energy in food preference. *The American Naturalist* 100, 611-617

Flaquer, C., Puig-Montserrat, X., Burgas, A., & Russo, D. (2008) Habitat selection by Geoffroy's bats (*Myotis emarginatus*) in a rural Mediterranean landscape: implications for conservation. *Acta Chiropterologica*, 10, 61-67. https://doi.org/10.3161/150811008X331090

Gillet, F., Tiouchichine, M.L., Galan, M., Blanc, F., Némoz, M., Aulagnier, S., & Michaux, J.R. (2015) A new method to identify the endangered Pyrenean desman (*Galemys pyrenaicus*) and to study its diet, using next generation sequencing from faeces. *Mamm. Biol*, 80, 505–509

Goiti, U., Garin, I., Almenar, D., Salsamendi, E., Aihartza, J. (2008) Foraging by Mediterranean horseshoe bats (*Rhinolophus euryale*) in relation to prey distribution and edge habitat. *J Mammal*, 89(2), 493–502. https://doi.org/10.1644/07-MAMM-A-054R2.1

Goiti, U., Aihartza, J., Guiu, M., Salsamendi, E., Almenar, D., Napal, M., Garin, I. (2011) Geoffroy's bat, *Myotis emarginatus*, preys preferentially on spiders in multistratified dense habitats: A study of foraging bats in the Mediterranean. *Folia Zool*, 60, 17–24. https://doi.org/10.25225/fozo.v60.i1.a3.2011

González, M.A. (2022) *Insectos de importancia Médico-Veterinaria en el Norte de España*. Publicación Independiente. 240 pp.

Hails, C.J. (1982). A Comparison of Tropical and Temperate Aerial Insect Abundance. *Biotropica* 14, 310–313. https://doi.org/10.2307/2388092

Krull, D., Schumm, A., Metzner, W., & Neuweiler, G. (1991) Foraging areas and foraging behavior in the notch- eared bat, *Myotis emarginatus* (Vespertilionidae). *Behav Ecol Sociobiol* 28, 247–253

Mata, V.A., Amorim, F., Corley, M.F.V., McCracken, G.F., Rebelo, H., Beja, P. (2016) Female dietary bias towards large migratory moths in the European free-tailed bat (Tadarida teniotis). *Biol Lett*, 12(3), 20150988. https://doi.org/10.1098/rsbl.2015.0988

Olive, C.W. (1981) Optimal Phenology and Body-Size of Orb-Weaving Spiders: Foraging Constraints. *Oecologia* 49, 83–87. https://doi.org/10.1007/BF00376902

Razgour, O., Clare, E.L., Zeale, M.R.K., Hanmer, J., Schnell, I.B., Rasmussen, M., Gilbert, T.P., Jones, G. (2011) High-throughput sequencing offers insight into mechanisms of resource partitioning in cryptic bat species. *Ecol Evol*, 1, 556–570. https://doi.org/10.1002/ece3.49

Rubio, G.D., & Moreno, C.E. (2010) Orb-Weaving Spider Diversity in the Iberá Marshlands, Argentina. *Neotrop. Entomol*, 39, 496–505. https://doi.org/10.1590/S1519-566X2010000400006

Siemers, B.M., & Swift, S. (2006) Differences in sensory ecology contribute to resource partitioning in the bats *Myotis bechsteinii* and *Myotis nattereri* (Chiroptera: Vespertilionidae). *Behav Ecol Sociobiol*, 59, 373-380. https://doi.org/10.1007/s00265-005-0060-5

Starik, N., Göttert, T., Zeller, U. (2021). Spatial Behavior and Habitat use of Two Sympatric Bat Species. *Animals*. 11, 3460. https://doi.org/10.3390/ani11123460

Steck, C.E., & Brinkmann, R. (2006) The trophic niche of the Geoffroy's bat (*Myotis emarginatus*) in south-western Germany. *Acta Chiropterologica* 8, 445–450. https://doi.org/10.3161/1733-5329(2006)8[445:TTNOTG]2.0.CO;2

Taweesub, C., Tanalgo, K.C., Sritongchuay, T., & Huges, A.C. (2021) Understanding global patterns of insectivorous bat dietary research. *Journal of Bat Research & Conservation*, 14, 134-144. https://doi.org/10.14709/BarbJ.14.1.2021.12

Vallejo, N., Aihartza, J., Goiti, U., Arrizabalaga-Escudero, A., Flaquer, C., Puig, X., Aldasoro, M., Baroja, U., Garin, I. (2019) The diet of the notch-eared bat (*Myotis emarginatus*) across the Iberian Peninsula analysed by amplicon metabarcoding. *Hystrix*, 30, 59–64. https://doi.org/10.4404/hystrix-00189-2019

Vamos, E. E., Elbrecht, V., & Leese, F. (2017). Short COI markers for freshwater macroinvertebrate metabarcoding *Metabarcoding Metagenom*. 1, e14625. https://doi.org/10.3897/mbmg.1.14625

7. Eskerrak eta oharrak

Esker onak eman nahi dizkiet, hasteko, laginketetan parte hartu duten guztiei, bereziki Aitor Arrizabalagari Karrantza eta Aulestiko laginak lortzeagatik, Denis Vincent-i Ortheze eta Salbaterrako laginak batzeagatik, eta Ane Carori gainerako laginketetan parte hartzeagatik. Baita Borjari eta Lurdesi ere haien etxe eta herrietako ateak zabaltzeagatik, bertan lagindu genezan. Esker onak ere, SGIKER-eko genomikako saileko Iratiri laginak anplifikatu eta sekuentziatzeagatik. Azkenik, eskerrak Jokabidearen Ekologia eta Eboluzioa taldeko guztiei. Ikerketa hau Eusko Jaurlaritzak eta Espainiako Gobernuak diruz lagundu dute (IT1163-19, IT1571-22, CGL-2015-69069-P eta 108123GB-I00). Nerea Vallejok Espainiako gobernuaren doktoretza aurreko formazio beka jasotzen du (FPU18/02701).

Nanopartikulen sintesian zeharreko tamainaren neurketa denbora errealean

Usue Olatz Aspiazu, Jose Ramon Leiza, Maria Paulis
POLYMAT, Kimika Aplikatua saila, Kimika Fakultatea, Euskal Herriko Unibertsitatea (UPV/EHU), Joxe Mari Korta zentroa, 20018 Donostia-San Sebastián
usue.aspiazu@polymat.eu

Laburpena

Partikulen tamaina eta partikulen tamainaren banaketa (PSD) latex polimerikoen ezaugarri garrantzitsuak dira, besteak beste filmaren eraketari eta latexaren erreologiari eragiten baitiete. Beraz, euren kontrola oso garrantzitsua da ur dispertsio polimerikoak ekoiztean. Kontrol-estrategia aurreratuek (berrelikadura-kontrola) partikulen tamaina lerroan neurtzea eskatzen dute, ibilbide optimoak jarraitu ahal izateko. Hainbat teknologia daude eskala nanometrikoko partikula sakabanatuen tamainak neurtu ahal izateko, baina guztiek kontzentrazio oso baxuetan lan egitea eskatzen dute. Arazo honi aurre egiteko, NanoPAT europar proiektua sortu zen, zeinen helburua partikula mota desberdinak denbora errealean eta lerroan monitorizatzeko zenbait teknika aztertzea den.

Hitz gakoak: lerroko monitorizazioa, emultsio polimerizazioa, partikula tamaina, partikula tamainaren banaketa, nanomaterialen karakterizazioa.

Abstract

Particle size and particle size distribution (PSD) are important properties of polymer latexes because they strongly affect the film formation and the rheology of the latexes. Thus, controlling them is of paramount importance during the production of waterborne polymeric dispersions. Advanced control strategies (feedback control) require online/inline measurements of the particle size to be able to track optimal trajectories. A number of technologies exist for the characterization of particles in suspension at the nanoscale. However, these techniques need highly diluted particle concentration samples. To overcome this problem, NanoPAT European Project was created, whose aim is to test the suitability of some new technologies to monitor the size of different type of particles in real time production.

Keywords: inline/online monitoring, emulsion polymerization, particle size, particle size distribution, nanomaterial characterization.

1. Sarrera eta motibazioa

Latexa, koloide polimeriko edo polimeroen ur-dispertsio ere deitua, uretan modu egonkorrean sakabanaturik dauden polimero partikula egonkorrek osatzen duten sistema da. Polimeroak pisu molekular handiko materialak dira eta lotura kobalente bidez elkarri loturiko monomero izeneko egitura unitate txikiagoez osaturik daude. Monomero horiek polimeroen unitate errepikakorrak dira.

Polimeroen ur dispertsioak hainbat aplikaziotan erabiltzen dira, hala nola, apaintzeko edo babes estaldurak sortzeko, litografian, itsasgarrietan, eraikuntzan edota ehungintzan (Azpeitia, 2012). Hormak, egunerokoan erabiltzen ditugun gailu teknologiko gehienak, mahaiak, sukaldeko tresnak, zapatak eta egunero ikusi, erabili eta ukitzen ditugun beste gauza asko, guk ia nabaritu ezin dugun geruza mehe batez estalirik daude (Alonso, 2016). Geruza fin hori, mota honetako barreiaketetan oinarriturik dago eta izan behar dituen ezaugarrien arabera, dispertsioa material mota desberdin batekin sortuko da.

Latexak sintesi prozesuan eratutako materialak dira, sintesi prozesu honetan jasandako egoeraren arabera propietate batzuk edo beste batzuk erakusten dituztenak (Asua, 2004). Horregatik, prozesuan oinarrituriko materialak (*products-by-process*) direla esaten da, euren propietateak (pisu molekularra, tamaina edota biskositatea, besteak beste) prozesuan bertan, erreaktore barnean, erabakitzen baitira. Latex partikuletan eragina duten ezaugarri garrantzitsuenak ondorengoak dira: konposizio kimikoaren banaketa (*Chemical Composition Distribution*, CCD), polimeroaren arkitektura (barne egitura), gainazalaren konposizioa, pisu

molekularraren banaketa (*Molecular Weigth Distribution*, MWD), partikulen morfologia (partikula osatzen duten faseen banaketa) eta partikulen tamainaren banaketa (*Particle Size Distribution*, PSD).

Material hauen bereizgarri esanguratsuenetako batzuk (biskositatea eta paketatzeko gaitasuna, esaterako), hein handi batean, tamainaren araberakoak dira. Horregatik, batez besteko tamaina eta tamainen banaketa karakterizatzea eta polimerizazio prozesuan kontrolatzea alderdi kritikoak dira fabrikazio prozesuen kalitate kontrolerako eta egonkortasunerako. Partikula tamainen banaketa funtsezkoa da latexaren biskositatea kontrolatzen duelako eta filmaren eraketari eta honek izango dituen propietateei zuzenean lorturik baitago (zenbat eta partikula txikiagoak, orduan eta txikiagoa da mintza eratzeko behar duen gutxieneko tenperatura (*Minimum Film Formation Temperature*, MFFT)). Halaber, filmaren kalitatea hobetu egiten da partikulen tamaina txikitzen den heinean. Partikulen tamainaren banaketa egokitzen bada, biskositate txikiagoak lor daitezke solido edukin berarekin eta honek solido eduki handiagoetara heltzen lagundu dezake (Mariz et al, 2011). Industria mailako jardueran, solido eduki handiko latexak (pisuaren % 55 inguruko fase sakabanatua dutenak) sintetizatzen dira, ekoizpenean erreaktorearen ahalmena maximizatzen baitute. Horrez gain, garraio kostuak minimizatzen dituzte eta lehortze-abiadura arinagoak ahalbidetzen dituzte. Aipatzen ari garen parametroak kontuan hartu beharreko ezaugarri garrantzitsuenetako batzuk dira, gainera formulazio komertzialek (pinturak eta tintek, besteak beste) aplikagarriak izateko behar dituzten propietate erreologikoak lortzeko bidea ere baitira (Asua, 2007). Gai hau mesprezatzeak produktua erabiltzean pintzel markak edota nibel desberdineko filmak sortzea ekar ditzake. Erreologia emultsio polimerizazio prozesuan zehar ere oso ezaugarri kritikoa da, erreaktore barneko nahastearen homogeneotasuna eta bero transferentzian eragin zuzena baitu.

Latexek gure inguruan duten erabilgarritasuna eta garrantzia ikusirik eta latexeko fase sakabanatuaren ezaugarriek bere aplikazioetan duten esangura kontuan hartuz, barreiaturik dauden partikula polimerikoen tamaina kontrolatzeko gai izatea ezinbestekoa da gaur egun. Lortu nahi den helbururako latexak izan behar dituen ezaugarriak ezagutuz eta partikula tamainari buruzko informazioa denbora errealean lortuz, bi hauek erlazionatu eta sistema desiratako egoerara bideratuko duen kontrol sistema itxi bat garatzeko aukera dago, ekoiztuko den latexak espero diren ezaugarriak beteko dituela ziurtatuz. Horregatik, lan honetan denbora errealeko monitorizazio beharrari buruz eta hau gainditzeko ematen ari diren pausuei buruz hitz egingo da, orain arte izandako aurrerakuntzak erakutsiz eta ondorengo pausuak zeintzuk izango diren zehaztuz.

2. Arloko egoera eta ikerketaren helburuak

Aurretik aipatu den bezala, latexaren amaierako ezaugarriak, emango zaion erabileraren araberakoak izango direnak (biskositatea eta filma sortzeko gaitasuna, adibidez), erreakzioan zehar lortutako partikula tamainaren menpekotasun zuzena dute (Mariz, 2011; Alonso, 2016; Asua, 2007). Gainera, dispertsio hauek sortaka sintetizatzen dira eta, sorta guztiek desiratako tamaina izango dutela eta sorta guztietako produktua berdina izango dela ziurtatzeko, denbora errealeko eta tokian tokiko karakterizazio tekniken beharra dago. Ondorioz, erreakzioaren bilakaera monitorizatu beharra dago, arazoren bat ikusiz gero, erreakzioa berbideratu ahal izateko.

Oraingoz, emultsioekin frogatuak izan diren partikula tamaina neurtzeko lerroz kanpoko teknikak daude eskuragarri gehien bat, zeintzuek diluzio altuak eskatzen dituzten. Online sistemei dagokienez, gutxi batzuk badaude merkaturatuta, baina guztiek diluzio altuak eskatzen dituzten, honek analizatzen ari garen partikulen egoera aldatu dezaketelarik. Lerroko sistemei dagokienez, erreaktore barnean zunda bat sartuz sintetizaturiko latexa bere horretan neurtzen dutenak, oraingoz ez dago merkaturatutako teknologiarik, horretarako gai diren teknikak garapen prozesuan daude oraindik.

Erabilera zehatz baterako sintetizatu beharreko latexaren partikula tamaina definitua badago, latexa ekoizteko erabiliko den prozesuan zehar partikula tamainaren bilakaera egokia zein den

ezagutu daiteke (*set-point*-a). Partikula tamainaren bilakaera hau unean uneko datuekin alderatu daiteke prozesua egoki bideratua dagoen edo arazorik duen jakiteko. Unean uneko datuak eta esperotakoak (teorikoki kalkulatuak) bat ez badatoz, kontrol sistema itxi baten bidez prozesuan eragiten duten parametroetan eragiteko aukera dago, sorta galdu aurretik arazoa konpondu ahal izateko. Horretarako, materialen elikaduretan eragin daiteke, adibidez. Modu honetan, prozesuak denbora errealeko karakterizazio sistema bat eta erantzuna emango duen denbora errealeko kontrol sistema itxi bat atxikiturik izango lituzke. Horrela, unean uneko ekoizpenaren eta ereduaren arteko desorekak kudeatu daitezke, espero ez diren perturbazioak zuzendu eta erreproduzigarritasuna hobetu.

Hainbat teknologia daude nano eskalako partikula barreiatuen tamainak eta partikula tamainen banaketak neurtu ahal izateko, besteak beste, argi estatikoaren edo dinamikoaren sakabanaketa (SLS edo DLS) eta mikroskopia elektronikoa (EM) (Zhang et al, 2021). Hala ere, teknika horiek partikulen kontzentrazio baxuekin soilik egin dezakete lan, lagina diluitzeko beharra azaltzen delarik, honek dakartzan eragozpenekin. Alde batetik, denbora eragozpenak azaltzen dira, lagina atera eta emaitza lortzen den momentuaren arteko denbora tartea handitzen baita, lorturiko datuak denbora errealetik aldenduz eta erabilitako ekipoaren araberakoa izango den denbora tarte bateko atzerapena sortuz. Aztertu nahi den sistemaren arabera, denbora atzerapen hau onargarria izan daiteke edo ez. Bestetik, lagina diluitu beharrak dakartzan eragozpenak ezin dira ahaztu, honek ekipo berrien beharra eta diluzio mailaren kontrol zehatza eskatzen baititu. Azkenik, diluzioak analizatu nahi den materialean bertan sortu ditzakeen aldaketak ezin dira baztertu, besteak beste, partikulen puztea. Ondorioz, lerroz kanpoko ekipo hauek ez dira egokiak lerroko prozesu industrialetarako eta denbora errealean eta lekuan bertan egin nahi diren neurketetarako. Laburbilduz, neurketak erreaktorean zuzenean egin ezin izateak denbora eta diru asko eskatzen duten lagina prestaketako urratsen beharra dakartzate eta, askotan, lagina atera eta ondoren analizatzeak dakarren denbora atzerapena ere kontuan hartzekoa da, honek denbora errealeko datuak ez izatea eragiten baitu, momentuko egoeraren kontrol eza ekarriz.

Lerroko monitorizazioak, besteak beste, ondorengo onurak ekar ditzake industria mailan: momentuko datuen eskuragarritasuna, kalitatearen kontrola prozesuan zehar, erantzun azkarraren ahalbidetzea, sorta desegokien murrizketa eta prozesu denboraren optimizazioa. Honek, aldi berean, ekoiztutako sorta guztiek nahi den partikula tamaina izatea ekarriko luke, sorta desegokien kantitatea gutxituz, eta dispertsioaren sintesian zehar sortu daitezkeen arazoak momentuan antzemanez, zenbait arazo, hala nola, partikulen agregazioak edota koagulazioak, larriago bihurtu baino lehen konpontzea ahalbidetzen du.

Denbora errealeko monitorizazioak ekar ditzakeen onurak kontuan izanik, jada existitzen diren hainbat teknikak eta beste zenbait teknika berri denbora errealeko partikulen tamaina lerroan eta denbora errealean karakterizatzea ahalbidetzeko, NanoPAT europar proiektua sortu zen (NanoPAT, 2020). Proiektuaren helburu nagusia nanopartikula mota desberdinak denbora errealean eta lerroan monitorizatzeko zenbait teknika aztertzea eta euren garapenean laguntzea da, industria prozesuaren amaieran, esperotako partikula tamaina duten dispertsioak lortu ahal izateko.

Aztertzen ari diren hiru teknikak Fotoi dentsitateko uhinen espektroskopia (*Photon Density Wave (PDW) sprectroscoy*), Uhertasun espektroskopia (*Turbidity Spectroscopy (TUS)*) eta Indar optofluidikoaren indukzioa (*OptoFluidic Force Induction (OF2i)*) dira.

Lehenengoa, lerroko eta tokian tokiko teknika bat da, zeinetan igorritako argi batek barreiaturik dauden partikulekin talka egin ondoren jasandako anplitude eta fase aldaketak kontuan hartuz, materialaren sakabanatze eta absortzio propietateak ezagutzeko aukera dagoen. Azkenik, sakabanatze propietateetan oinarrituz, partikula tamaina ezagutu daitekeelarik.

Bigarrena, lerroko eta tokitik kanpoko teknika bat da, zeinetan uraren uhertasuna uhin luzera desberdinetako argiaz aztertuz, partikula tamainarekin lotu daitekeen. Metodo honen mugetako bat, uhertasun altuetan argiaren transmisioa nulua denez, diluitu beharra dagoela da. Hau da, laginaren

uhertasunak uhin luzerarekin duen aldaketak partikula tamainari buruzko informazioa ezkutatzen du bere barnean, baina informazio hori lortu ahal izateko, argiaren transmisioak ezin du nulua izan.

Hirugarrena ere lerroko eta tokitik kanpoko teknika bat da, non partikulek kontrolaturiko fluxu batean mugitzen direnean duten abiadura eta direkzioa aztertuz, partikulen ibilbidea ezagutuz, euren partikula tamaina kalkulatu daitekeen. Partikula bakunen ibilbidea aztertu beharra dagoenez, teknika honek lagina diluitzea eskatzen du baita ere.

Ondorengo lanean, lerroko eta tokian tokiko nahiz kanpoko eta lerroz kanpoko tekniken arteko konparaketa bat aurkeztuko da. Horretarako, industria mailan hedaturik dagoen polimero sintesi bat laborategi eskalan sintetizatu eta prozesuan zeharreko partikula tamainaren aldaketa teknika desberdinekin aztertuko delarik, zehazki lerroko eta tokian tokiko Fotoi dentsitateko uhinaren espektroskopia (PDW) eta lerroz kanpoko Argi dinamikoaren sakabanaketa (DLS) teknikekin.

3. Ikerketaren muina

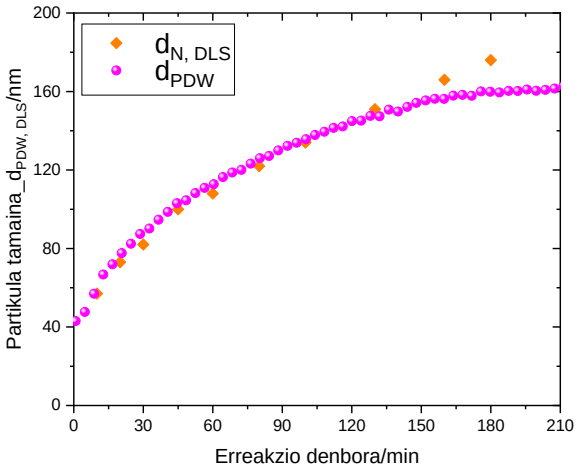
Zuzeneko neurketak lerroz kanpokoarekin konparatuz, honek dakartzan onurak erakusteko, proiektuan zehar azterturiko polimero sintesi bat eta bere analisia aurkeztuko dira jarraian. Aurkezturiko datuak lerroko Fotoi dentsitateko uhinen espektroskopiarekin (PDW) eta lerroz kanpoko Argi dinamikoaren sakabanaketarekin (DLS) lorturikoak dira.

Koloide polimerikoak metodo desberdinak jarraituz lor daitezke, erabiltzen den teknika nagusienetako bat emultsio bidezko polimerizazioa delarik. Emultsio bidezko polimerizazioan, uretan disolbagarritasun txikia duen monomero bat (edo gehiago), emultsionatzailea, hasarazlea eta ura nahasten dira. Nahaste honetan (emultsioa) monomero tantak eta surfaktanteak sorturiko monomeroz puztutako mizelak eratzen dira eta hasarazlea eta monomeroaren zati disolbagarria uretan disolbaturik izango dira. Emultsioa erreakzio tenperaturara igoaz hasarazlearen deskonposizioa gertatuko da erradikalak sortuaz. Erradikalak uretan disolbatutako monomeroarekin erreakzionatuko du oligomero aktibo eta gainazal-aktiboan diren espeziak sortuaz. Hauek mizeletara adsorbatuko dira eta hauek polimero partikula bihurtu monomeroa polimerizatuaz.

Zehazki, ondorengoa da lan honetan aztertu den sintesi prozesua: metil metakrilato, butil akrilato eta azido metakriliko monomeroen arteko emultsio kopolimerizazioa ereindun erreaktore erdi-jarraituan. Bertan, 50 nm-ko tamainako polimero partikula txikietatik hasi eta monomeroa, surfaktantea, ura eta hasarazlea 180 minutuz elikatuz, partikulen hazkuntza eman da, 160 nm-ko partikulak lortzeko helburuarekin. Behin erregaien elikadura burututa, prozesua beste 30 minutuz mantendu da erreakzio tenperaturan monomero guztia kontsumitu dadin eta ahalik eta monomero konbertsio handienak lortzeko. Prozesu hau lerroko PDW espektroskopiaz jarraitu da eta prozesuan zehar zenbait lagin atera dira, lerroz kanpoko DLS bidez analizatu eta bi tekniken bidez lorturiko emaitzak konparatzeko.

Lorturiko emaitzak ondorengo irudian aurkezten dira (1. Irudia):

1. irudia. Ereindun emultsio polimerizazio erdi jarraituaren sintesian zehar lorturiko partikula tamainaren analisia, lineako eta denbora errealeko PDW espektroskopia eta lineaz kanpoko DLS bidez.

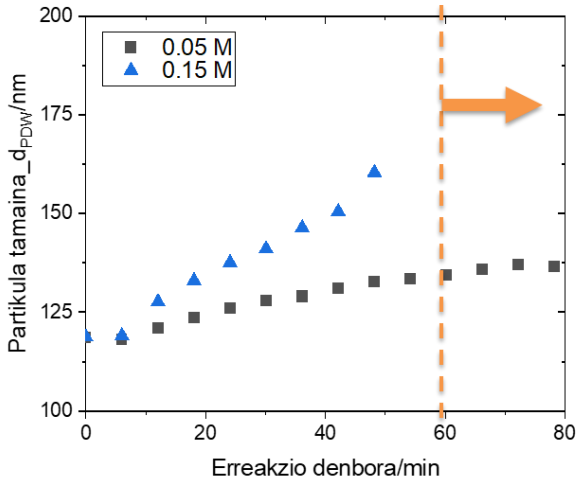


Irudian ikus daitekeen bezala, bi teknikekin lorturiko emaitzak bat datoz prozesu guztian zehar. Honek, etorkizun handiko teknikak sortzen ari direla erakusten du, orain arte erabili izan direnekin alderatuz, zehaztasun handiko emaitzak erakusten baitituzte. Horrez gain, zehaztasuna mantentzeaz gain, datu gehiago, arinago eta inguruko egoera fisiko eta kimikoa eraldatu gabe neurtzea lortzen da.

Bestalde, lerroko eta denbora errealeko monitorizazioak analisi puntu gehiago izatea ahalbidetzen du, prozesu guztiaren jarraipena gertutik egitea eskaintzen duelarik. Prozesuan zehar arazorik aurkituz gero, segundo gutxiren buruan datuetan desbideraketa ikusiko litzateke eta hau nabaria bihurtu aurretik zuzenketak egin eta konpondu ahalko litzateke, produkzio sisteman eraginik izan ez dezan eta prozesu amaieran lortutako produktuak esperotako propietateak izan ditzan.

Arazoak antzemateko ahalmena aztertze aldera, latex bateko partikulen agregazioa behartu da. Horretarako, latex egonkor bat hartu eta honen gainean gatz disoluzio bat (NaCl 0,05 eta 0,15 M kontzentraziotan) gehitu da, ondorengo datuak lortu direlarik (2. Irudia):

2. irudia. Partikulen agregazio saiakuntzaren analisia lineazko eta denbora errealeko PDW espektroskopiaren bidez.

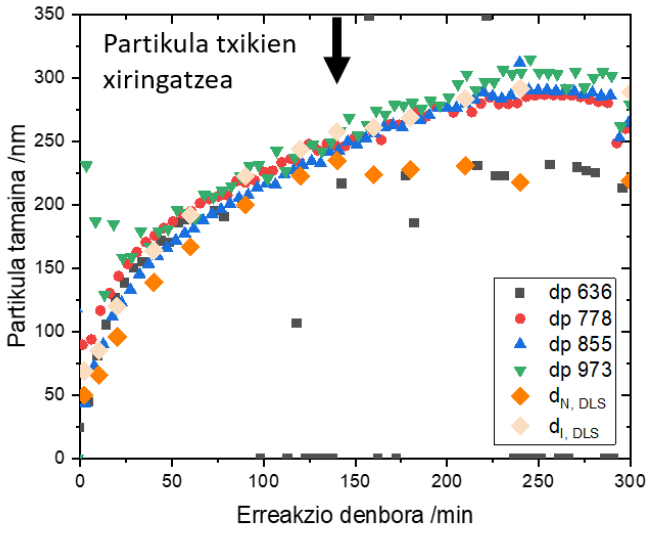


Bigarren irudian ikus daitekeen bezala, partikulen agregazioa hasierako unetik antzemateko gaitasuna erakusten du denbora errealeko teknika honek, bai gatza poliki elikatzen denean,

zeinetan agregatu txikiak sortzen diren, nahiz gatza azkar elikatzen denean, zeinetan agregatu handiagoak sortzen diren.

Horrez gain, nukleazio berriak antzemateko ahalmena ere aztertu da. Horretarako, nukleazio berrien sorrera simulatu nahian, sintesiaren erdian partikula txikiak xiringatu dira eta honek datuetan zuen eragina aztertu da. Lorturiko emaitzak 3. irudian erakusten dira.

3. irudia. Nukleazio berrien sorrera antzemateko saiakuntzan zehar lortutako emaitzak lerroko eta denbora errealeko PDW espektroskopiaren bidez.



Ikus daitekeen bezala, nukleazio berrien sorrera antzemateko gaitasunak zenbait limite ditu, nano eskalan partikula handiek txikien baino gehiago sakabanatzen baitute argia, txikien sakabanaketa ezkutatuz.

4. Ondorioak

Lanean zehar ikusi ahal izan den bezala, azken urteetan aurrerapauso handiak eman dira nano eskalako materialen monitorizazio prozesuen inguruan. Hala ere, neurketa sistema hauek duten konplexutasuna dela medio, euren industria mailako garapena nahiko mugatua da oraindik.

Lan honetan erakutsi den bezala, garapen prozesuan dauden zenbait teknika lineaz kanpoko teknikak bezain fidagarriak dira eta lineaz kanpokoak baino datu jarraiagoak ematen dituzte. Hortaz, lineako analisia egiteko teknologia berrien garapena bide onetik doala esan genezake.

5. Etorkizunerako planteatzen den norabidea

Gero eta ezagunagoak dira monitorizazio prozesuek izan ditzaketen onurak eta hauek erabilgarri bihurtzea ezinbestekoa da modu zabal baten aplikatzea lortzeko. Gauzak horrela, jada garapenean dauden zenbait teknikek partikulen tamainaren analisirako eskaintzen duten laguntza ikusirik, teknika hauek laborategian aztertu eta ahalik eta azkarren industria mailan inplementatzeko apustua egin beharra dago.

Etorkizunari begira, bi norabide planteatzen dira. Alde batetik, orain arte sortuak diren tekniken garapenean jarraitu nahi da, hauen erabilera material mota eta egoera desberdinetan aztertuz. Bestetik, monitorizazio sistema hauen industria mailako aplikazioan sakonduko da, laborategi eskalan eta industria eskalan dauden beharrak desberdinak bait dira. Gainera, industria mailan lan egiten duten ekipoek behar dituzten segurtasun ziurtagiri zehatzak direla eta, zenbait ekipo ingurune hautan lan egin ahal izateko moldatu beharra dago.

6. Erreferentziak

Alonso, Z (2016). Water-borne coatings and pressure sensitive adhesives produced with polymerizable surfactants. *PhD*, UPV/EHU.

Asua, J. M. (2004). Emulsion Polymerization: From Fundamental Mechanisms to Process Development. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, *42*, 1025–1041.

Asua, J.M. (2007). Polymer Reaction Engineering. *s.l. : BlackWell Publishing*.

Azpeitia, M. (2012). Monitorización, modelado y seguridad de procesos de polimerización en emulsión de acetato de vinilo y acrilato de butilo. PhD. POLYMAT (UPV/EHU).

Mariz, I. Leiza, J.R., de la Cal, J.C. (2011). Competitive particle growth: A tool to control the particle size distribution for the synthesis of high solids content low viscosity latexes. *Chemical Engineering Journal, 168,* 938-946.

NanoPAT European Project (HORIZON 2020, GA number: 862583). Process Analytical Technologies for Industrial Nanoparticles Production.

Zhang, S., Zhang, Q., Shang, J., Mao, Z., Yang, C. (2021). Measurement methods of particle size distribution in emulsion polymerization. *Chinese Journal of Chemical Engineering, 39*, 1-15

7. Eskerrak eta oharrak

Eskerrak NanoPAT proiektu europarrari (proiektu zenbakia 862583) proiektu hau aurrera eramateko emandako laguntza ekonomikoagatik eta proiektuan parte hartzen ari diren enpresa, unibertsitate eta zentro teknologiko guztiei.

Kakatokien eraginkortasuna ur-satorra (*Galemys pyrenaicus,* Talpidae) detektatzeko eta haren banaketaren patroiak deskribatzeko

Jon Levy Otheguy[1]; Jorge González-Esteban[2]; Arturo Elosegi[3] eta Joxerra Aihartza[1]
[1]*Zoologia eta Animalia Zelulen Biologia, Zientzia eta Teknologia Fakultatea, Euskal Herriko Unibertsitatea UPV/EHU*
[2]*DESMA Estudios Ambientales, Ituren, Nafarroa*
[3]*Landareen Biologia eta Ekologia Saila, Zientzia eta Teknologia Fakultatea, Euskal Herriko Unibertsitatea UPV/EHU*
jon.levyotheguy@orange.fr

Laburpena

Duela urte gutxi batzuk proposatu da ur-satorra detektatzeko kakatoki artifizialak eraikitzea, alegia, kanpin-denda antzeko batzuk errekan eraikitzea alfonbra batzuekin. Metodo hau eraginkorra da, baina ez da bere efizientzia zehaztu, ez eta deskribatu nola aldatzen den urtaroaren arabera. Hemen kakatoki artifizialen efizientzia neurtzeaz gain, metodoa optimizatu dugu. Emaitzek erakutsi dute kakatokiak urte osoan berdintsu erabiltzen direla erreka-sare osoan. Kakatokietan beste ur-sator baten gorotzak jartzeak ez du ur-satorren detekzioa hobetu. Azkenik, kakatokiak finkatu eta bertako emaitzak ikuskatzearen arteko denbora-tarte egokiena 7-11 egun dela ondorioztatu da. Metodologia honek, berez detektatzen oso zaila den espezie mehatxatu honen kudeatzaileentzako logistika errazten du.

Hitz gakoak: Gorotzak, Kakatokia, Ur-satorra, Detekzio metodologia, Optimizazioa, Artikutzako arroa

Abstract

Some years ago, the construction of artificial latrines was proposed to detect the Pyrenean Desman, i.e. to build the semblance of a "camping tent" with a mat in the river. This method works well, but its efficiency has yet to be specified, and its seasonal variation has yet to be described. Here, in addition to determining the efficiency of artificial latrines, we optimized the method. The results show that the latrines are used equally over the year throughout the stream network. In the latrines, depositing the faeces of another individual did not improve the detection of Pyrenean Desman. Finally, we found that the best time interval between fixing the latrine and checking its results is 7-11 days. This methodology improves the logistics of the managers on this threatened species, which is very difficult to detect.

Keywords: Faeces, Latrines, Pyrenean Desman, Detection methodology, Optimisation, Artikutza Valley

1. Sarrera eta Motibazioa

Espezie basatien egoera eta joerak ezagutzeko populazioen jarraipen errepikatuak ezinbestekoak dira (Caughley eta Sinclair, 1994). Arriskuan diren espezieen kasuan, ahal dela banakoak harrapatzea saihestu behar denez, metodo alternatiboak erabiltzen dira, hala nola, argazki tranpak edota gorotz-tranpak (Walters et al., 2013). Gorotzekin, bereziki, lan asko egiten da, genetika molekularrari esker hura egin duen espeziea identifikatu baitaiteke (Gillet et al., 2015).

Ur-satorra edo Piriniotako muturluzea, *Galemys pyrenaicus* (E. Geoffroy Saint-Hilaire, 1811), ugaztun intsektiboro erdi-urtarra da, satorraren familiakoa (Talpidae). Bizimodu gautarra duen animalia hau mendiko erreketan bizi da, Iberiar Penintsulako iparraldean eta Pirinioen bi aldeetan. Nagusiki ornogabe urtarrez elikatzen da (Esnaola et al., 2021). Ur-satorren banaketa animaliak tranpen bitartez harrapatuz zehaztu izan da (González-Esteban et al., 2003), baina azken aldian, ikerlariek haien gorotzak bilatu izan dituzte erreka batean ur-satorrik baden zehazteko (Charbonnel et al., 2015). Pirinioetako muturluzea Bernako Hitzarmenaren (II. Eranskina) eta Europako Habitaten Zuzentarauaren bidez (II. eta IV. Eranskinak) babesturik dago (Europar Batasuneko Kontseilua, 1992) eta Naturaren Kontserbaziorako Nazioarteko Batasunaren (IUCN) zerrenda gorrian Arriskupeko gisa sailkatu da (Quaglietta, 2021). Haren populazioak jarraitzeko metodo nekoso eta garestiek, ordea, ikerketa eta kudeaketa mugatzen dituzte.

2. Arloko egoera eta ikerketaren helburua

Ur-satorraren jarraipena hobetzeko, González-Esteban et al. (2018)-ek kakatoki artifizialak ezarri zituzten errekaren ibilguan. Kakatokia, alfonbra batek estaltzen duen harri meta batek osatutako estruktura artifiziala da, non, ur-satorrek gorotzak uzten dituzten. Material horrek ahalbidetu zuen gorotz

fresko kopuru handiak eskuratzea, adibidez, gorotzen analisi genetikotik dieta aztertzeko (Esnaola et al., 2021). Berrikitan, egin dugun bideoak iradokitzen du ur-satorrek kakatoki artifiziala markatze toki gisa erabiltzen dutela, eta ez atsedenleku bezala. Leku batean gorotzak aurkitzeak, bistan denez, bertan ur-satorra dagoela frogatzen du. Baina hortik aurrerako interpretazioa oso ilun geratzen da oraindik. Ez dakigu populazio banako guztiek baliatzen dituzten kakatokiak, ez eta aldaketarik ote den urtaroen edo kokapenaren arabera. Ikerketa honek, ur-satorra detektatzeko eta haren banaketaren patroiak deskribatzeko kakatokien erabileraren eraginkortasuna dauka helburu. Hurrengo galderei erantzuteko asmoa daukagu :

i. Kakatokian ur-sator gorotzak jartzeak haren eraginkortasuna aldatzen ote du?
ii. Kakatokien erabilera aldatzen ote da urtean zehar eta espazialki erreka sare batetan?
iii. Zein da denbora tarte hoberena kakatokien jartzearen eta ikuskatzearen artean?

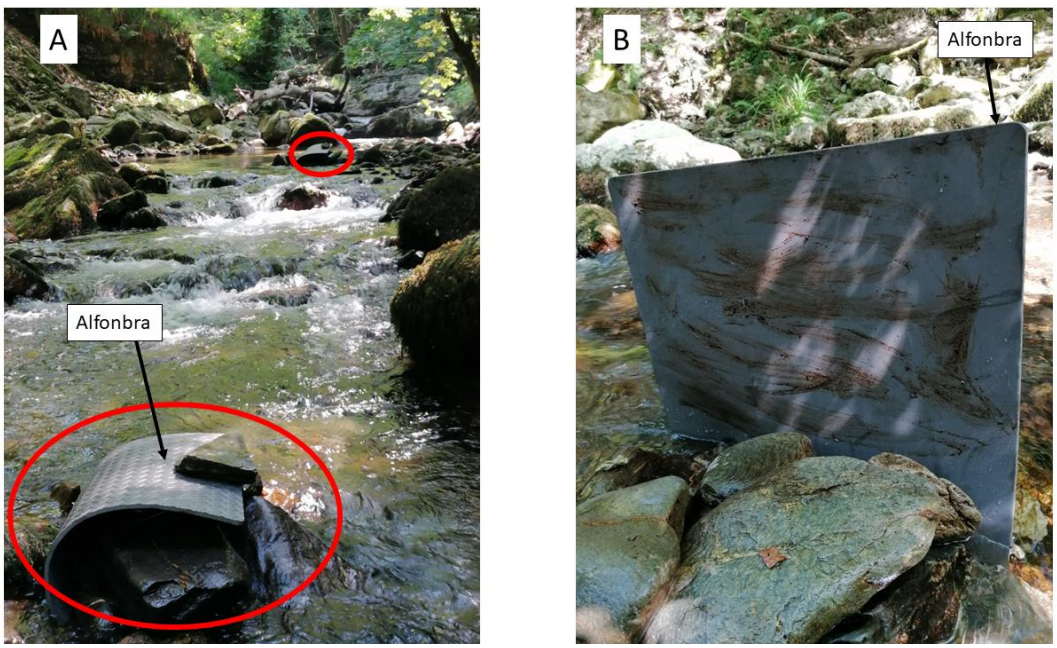
3. Ikerketaren muina

Ikerketa hau Artikutzan egina da. Artikutza natura erreserba gisa kudeatu du Donostiako udalak 1919tik goiti, kalitate oso oneko ur edangarria eskuratzeko, eta nagusiki pagadiz eta hariztiz estalita dago (Castro, 2009). Hango errekak dira eskualdeko onenak eta ekosistema aberatsenak dauzkate, ur-sator populazio garrantzitsu batekin (Esnaola et al., 2018).

Gure lanerako 29 km-ko ibai tartea aztertu dugu, 6 errekatan banatua, halako modutan non pertsona batek lan egun batetan jarraipen sareko kakatoki guztiak ikuska zitzakeen. Materialari dagokionez, González-Esteban et al. (2018)-ek asmatutako kakatoki artifizialak erabili ditugu: dentsitate altuko etileno-binilo azetatozko alfonbrak (630x630x12 mm), sakonera txikiko urlasterren erdian, harritzar pilaketa bat estaliz, 0,25 m² inguruko azalera lehorra estaltzen duen ‘kanpin-denda’ bat eratuz (1. irudia). Arroken eta alfonbraren arteko tartea ez zen 15 cm baino handiagoa, animalia handiagoek (adibidez, ur-zozoek) erabil ez zitzaten.

3.1. Gorotzez beitatzearen eragina kakatokien eraginkortasunean

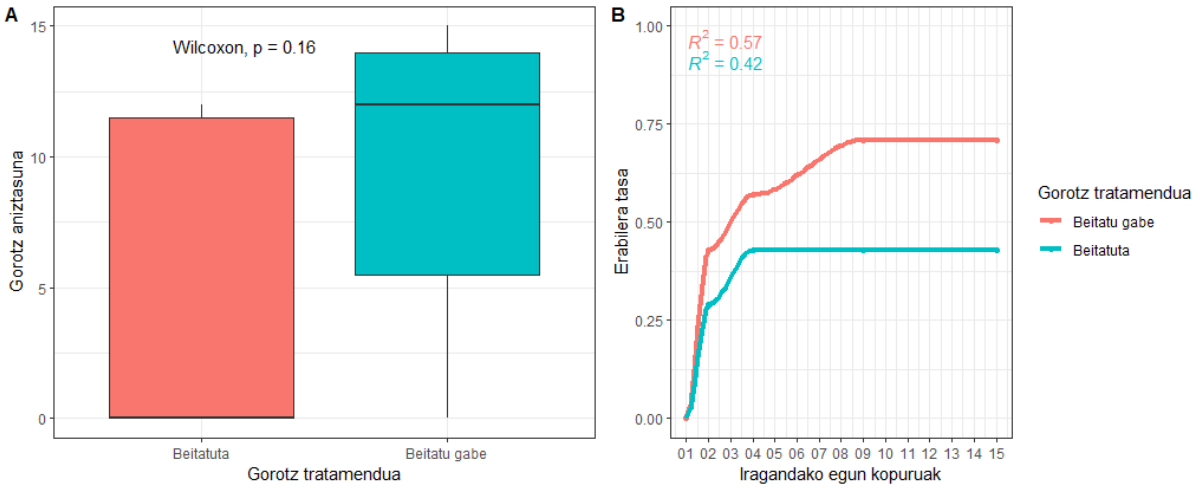
Ikusteko kakatokian gorotzak izateak ur-satorrak bertara erakartzen ote dituen, 7 kakatoki pare ezarri dira ikerketa eremuan. Pare bakoitzean, kakatoki bat utzi izan da kontrol modura (gorotz beitarik gabe) eta bestea alfonbraren barruko aldea, arroko beste toki batetik bildutako gorotzekin igurtzi/beitatu da (1. irudia). Kakatoki pareak behin jarrita, 4 aldiz bisitatuak izan dira 15 eguneko tartean. Bisita bakoitzean, gorotz kopurua zenbatu dugu eta kakatokia garbitu dugu, gorotz zaharrak eta berriak ez nahasteko.



1. Irudia : Kakatokien disposizioa elipse gorri baten bidez agerraraziak (A) eta gorotz-beita zuen kakatoki baten adibidea (B). Argazkiak : Jon Levy Otheguy

Jarraipen honetan, muturluzeek, gorotzez beitatu diren 3 kakatoki eta beitatu gabeko 5 erabili dituzte (2. irudia). Gorotz-beitak ez du eragin esangarririk izan muturluzeek metatutako gorotz kopuruan (Wilcoxon signed rank testa: W = 13,5, p-balioa = 0,16). Bestalde, beitarik gabeko kakatokiek gorotz

gehiago metatu dituzte eta azkarrago, baina diferentziak ez dira estatistikoki esangarriak izan (Welch t-testa: t = 1,08, df = 6,77, p-balioa = 0,32).



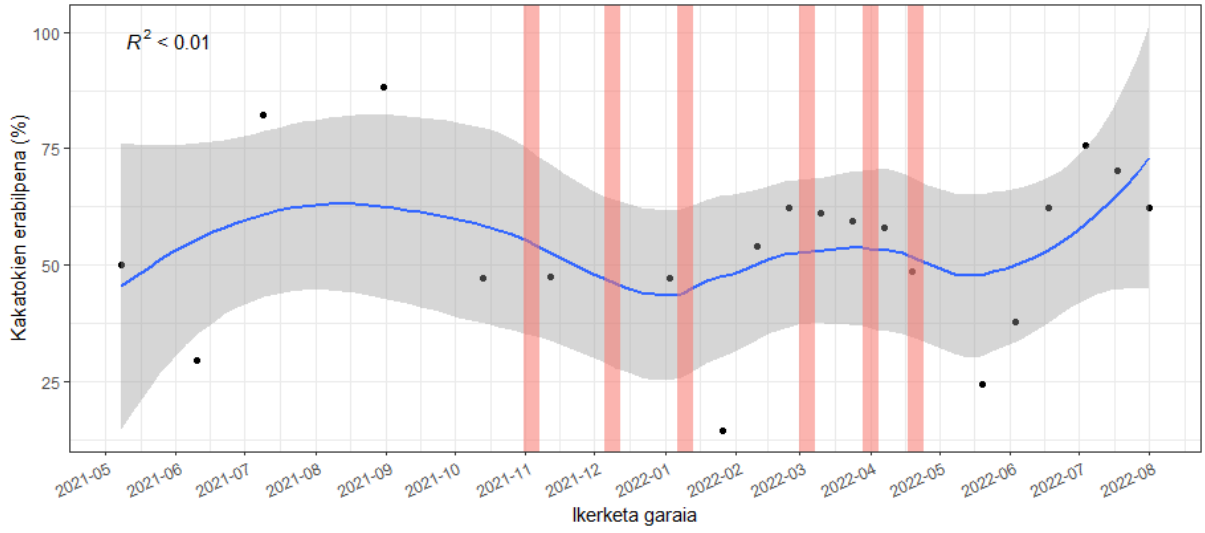
2. Irudia : Gorotzez beitatutako vs. beitatu gabeko kakatokien esperientziako emaitzak. (A) gorotz kopurua. (B) erabilera metatuaren kurba.

Emaitza horiek adierazten dute beste banakoen gorotzek ez dutela eragiten lekuko banakoen markatze jarreran. Hau da, gorotzak ez direla ez erakarle ez uxatzaile. Horrek ez du esan nahi animaliek ez dituztenik erabiltzen nolabaiteko markak ezartzeko. Esperientzia errepikatu egin beharko litzateke inguruko beste arro batzuetan —eta lagin handiagoaz— emaitza sendoagoak edukitzeko.

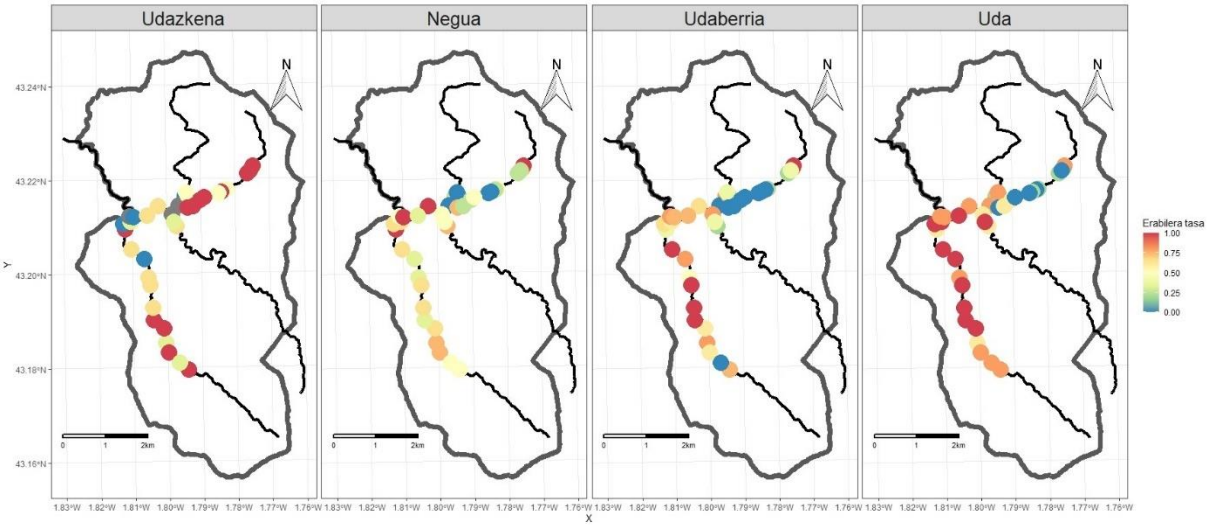
3.2. Kakatokien erabileraren aldakortasuna denboran eta espazioan

Jakiteko kakatokien erabilpena espazio eta denboraren arabera aldatzen ote den, 37 kakatoki sakabanatu ditugu aztertutako erreka sarean, eta 15-30 eguneko tarteetan 26 aldiz bisitatu ditugu, 2021ko maiatzaren 1tik 2022ko agorrilaren 1a arte. Bisita oro, kakatoki guztiak ikuskatuak, gorotzak zenbatuak eta errekako urarekin garbituak izan dira; eta, jakina, uholdeek suntsitutako kakatokiak berreraikiak.

Kakatokien bataz besteko erabilera-frekuentzia %54,09 ± 18,52 izan da. Denboran zehar izan dira gorabeherak erabileran (3. irudia), baina ematen du gorabehera horiek ez daudela eurite handiei lotuta. Tamalez, urte eta erdiko jarraipena izanik, ezin dugu azterketa estatistiko sendorik egin hala ote den egiaztatzeko.



3. Irudia : Kakatokien erabilpen tasa ikerketan zehar, LOESS modeloaren bidez irudikatua (marra urdina) eta bere %95ko konfiantza tartearekin (grisez). Jarraipenean eragin zezaketen eurite gogorrak marra bertikal gorriekin adieraziak dira.



4. Irudia : Kakatoki bakoitzaren erabilera tasaren bilakaera urtaro bakoitzaren arabera

Urtaroen arabera, kakatoki zehatzen erabilera irregularra da, salbu Enobietako goiko parteko kakatokian eta Elama goi-erdialdeko parteko kakatokietan (4. irudia). Dena den, ez da patroi argirik ikusten banaketa espazialari dagokionez. Emaitza horrek ahalbidetzen digu hurrengo hipotesia baztertzea: eurite handietako garaietan arroetako iturburuetan aurkituko genuela erabilera tasa handiena, eta lehortze garaietan arroetako behetako parteetan. Kakatokien erabileraren aldakortasunean sakontzeko Kruskal-Wallis test ez-parametrikoa erabili dugu (1. taula). Test horrek erakusten du ez dela bi faktore horien eragin esangarririk kakatokien erabileran, baina ez daudela esangarritasunetik urrun.

1. Taula : Kakatoki indibidualen erabil tasaren bilakaera urtaro bakoitzaren arabera

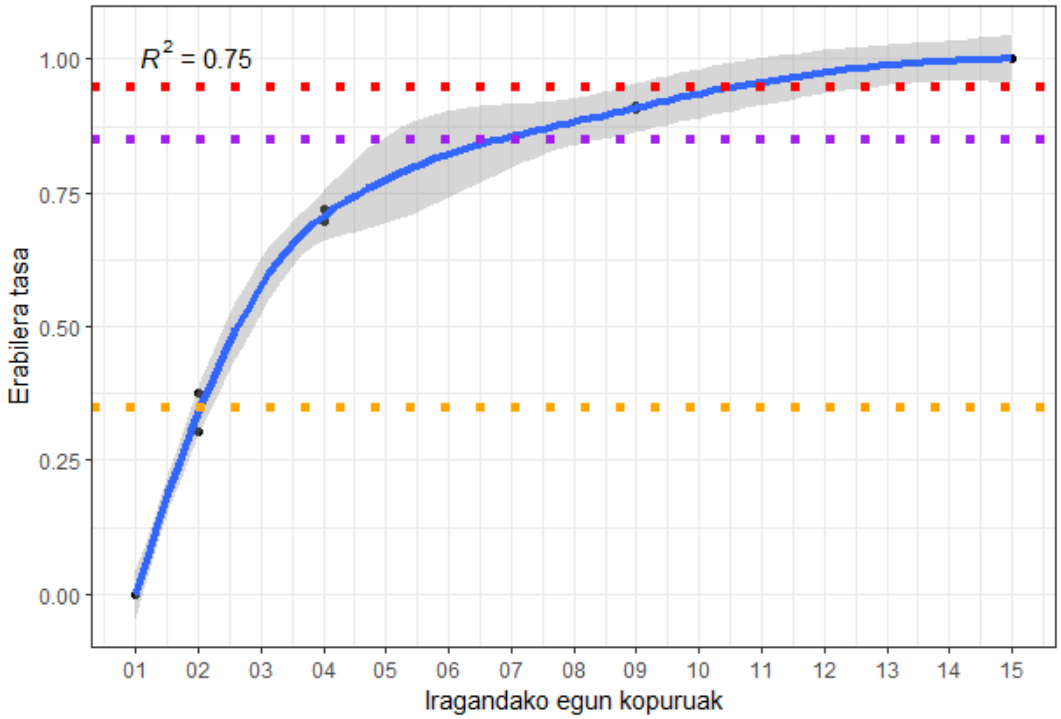
Faktoreak	Khi-karratua	df	p-balioa
Kakatokien kokapena	48,43	36	0,081
Urtaroak	6,39	3	0,094

Oro har, badirudi kakatokiak gehixeago erabiltzen direla udan neguan baino. Jarraipen laburraren ondorioz, ordea, nekez froga daitezke burura heldu zaizkigun hipotesiak, hala nola, ur-satorretan populazioaren gorabehera handirik ematen ote den.

Bestalde, ikerketako datuek erakusten dute urte osoan zehar Artikutzako arroan badirela ur-satorrak, eta eremu beretsutan direla. Beraz, kakatokiek ez dute islatzen animalien mugimendu edo migraziorik arroaren zati batzuetatik bestetara. Emaitza honek, agian, garai batzuetan gehiago markatzeko joera daukatela, edo beste batzuetan kakatoki natural gehiago topatzen dituztela erakusten ahal du.

3.3. Bisiten arteko denbora tartearen optimizazioa

Kakatokien eraikitze eta ikuskatzearen beharrezko denbora tartea ezagutzeko (iii galdera), lehenago aipatu ditugun bi esperimentuen kakatokiak baliatu ditugu, 51 kakatoki orotara osatzen dutenak. Kakatokien ikuskatzeak, 1., 4., 8. eta 14. egunetan iragan dira haiek eraiki eta gero. Azken bisita honen ondoren, erabiliak izan diren kakatokien kopurua denbora tarte horretan erabiliak izan daitezkeen proportzio maximo bezala kontsideratzen da, hau da 1. Datuek erakusten dute (5. irudia) 7. egunetik aurrera kakatokien %85 erabiliak izan direla, eta 11. egunetik aurrera %98. Kakatokien %35 lehen egunetik erabiliak izan dira. Beraz, uste dugu 7-11 egunekoa dela bi bisiten arteko tarte optimoa. Gorotza freskoak eskuratzeko, berriz, lehen gaua iragan eta gero bigarren bisita egin daiteke edozein analisi egiteko (analisi genetikoak, bazka-analisiak,…).



5. Irudia: : Erabil tasaren akumulazio kurba LOESS modeloari esker lortua. Gorriz den puntuzko marra 0,95ko proportzioaren muga, ubelez dena 0,85ko proportzioaren muga eta laranjez dena 0,35ko proportzioarena adierazten dute

4. Ondorioak

Kakatoki artifizialak ur-satorren presentzia detektatzeko ezezik, haren dieta, osasun-egoera eta beste hainbat helburutarako tresna eraginkorrak dira. Kakatoki hauetan gorotz arrotzak jartzeak ez du animalien erabilera handiagotzen. Arro oso batean zehar edozein urteko momentuetan detekta daiteke ur-satorra, berdin muturreko fenomeno meteorologikoak gertatu berritan ere. Azkenik, bi bisiten arteko denbora optimoa 14 egun baino laburragoa da, 7-11 eguneko denbora tartekoa gomendatzen delarik. Horrek, kudeatzaileendako lan-logistika errazten du.

5. Etorkizunerako planteatzen den norabidea

Ikerketa honek ezagutza berriak ekarri dizkigu, baita etorkizunari begira hainbat galdera berri ere sortu. Banakoen mailan, kakatokien erabilpenari buruz ez dakigu ezer. Sexu edota adin ezberdineko banakoek era berean erabiliko ote dituzte kakatokiak? Kakatoki bat beti banako berak baliatuko ote du edo indibiduo multzo batek erabiliko du? Indibiduo batek fideltasuna ote dio ber kakatokiari edo hurbiletako beste kakatokiak baliatuko ote ditu inongo fideltasun ezaugarririk agerrarazi gabe?

Galdera horiez gain, kakatokiek populazioaren epe ertaineko dinamikari buruzko informazioa ere eskain dezakete. Adibidez, gure emaitzak Amaiur Esnaolaren doktoretza tesirako (Esnaola, 2020) 2016. urtean ezarritako kakatokiek lortutakoekin konpara ditzakegu. Nahiz eta lana berdin-berdina ez izan, orduan ere Elaman zehar hamar bat kakatoki jarri ziren, baina guk baino askoz gorotz gehiago pilatu ziren: 1,38 ± 0,80 gorotz egunka eta kakatokika 2016an (Esnaola, argitaratu gabeko datuak), 0,49 ± 0,17 gorotz egunka eta kakatokika 2022an. Emaitza honek iradokitzen du aldaketa handiak, ez dakigu ziklikoak ala ez, izan direla Artikutzako ur-satorren kopuruan. Espezie honen dibertsitate genetikoa oso apala, eta odolkidetasun koefizientea oso altua denez (Escoda et al., 2022), gorotz-pilaketen gainbehera horiek oso kezkagarriak dira. Ikusiko balitz populazioa iraungipen-zurrunbiloan sartua dela, hurbileko populazioen artean banakoen translokazioa bultzatu beharko litzateke (Griffith et al., 1989).

Arazo metodologiko hauez gain badago, ordea, galdera sakonago bat: zer eragina da ur-satorren gainbehera orokor eta arriskutsua, eta nola aurre egiten ahal zaio? Uste dugu kakatoki artifizialak tresna bikaina eskaintzen dutela galdera hauei erantzuteko.

6. Erreferentziak

Castro, A., 2009. Evolution and structure of Artikutza, an 80-year-old beech forest in Navarra (Northern Spain). Munibe Ciencias Naturales. Natur Zientziak 257–281.

Caughley, G., Sinclair, A.R.E., 1994. Wildlife ecology and management. Blackwell Science.

Charbonnel, A., Buisson, L., Biffi, M., D'Amico, F., Besnard, A., Aulagnier, S., Blanc, F., Gillet, F., Lacaze, V., Michaux, J.R., Némoz, M., Pagé, C., Sanchez-Perez, J.M., Sauvage, S., Laffaille, P., 2015. Integrating hydrological features and genetically validated occurrence data in occupancy modelling of an endemic and endangered semi-aquatic mammal, *Galemys pyrenaicus*, in a Pyrenean catchment. Biological Conservation 184, 182–192. https://doi.org/10.1016/j.biocon.2015.01.019

Directive, H., 1992. Council Directive 92/43/EEC of 21 May 1992 on the conservation of natural habitats and of wild fauna and flora. Official Journal of the European Union 206, 7–50.

Escoda, L., Hawlitschek, O., González-Esteban, J., Castresana, J., 2022. Methodological challenges in the genomic analysis of an endangered mammal population with low genetic diversity. Sci Rep 12, 21390. https://doi.org/10.1038/s41598-022-25619-y

Esnaola, A., 2020. The spatial and trophic ecology of the Pyrenean desman *Galemys pyrenaicus*: key factors for conservation. Doktore Tesia. Euskal Herriko Unibertsitatea.

Esnaola, A., González-Esteban, J., Elosegi, A., Arrizabalaga-Escudero, A., Aihartza, J., 2018. Need for speed: Preference for fast-flowing water by the endangered semi-aquatic Pyrenean desman (*Galemys pyrenaicus*) in two contrasting streams. Aquatic Conserv: Mar Freshw Ecosyst 28, 600–609. https://doi.org/10.1002/aqc.2893

Esnaola, A., Mata, V., Arrizabalaga-Escudero, A., González-Esteban, J., Larrañaga, A., Rebelo, H., Elosegi, A., Aihartza, J., 2021. It is the ambience, not the menu. Prey availability does not drive habitat selection by the endangered Pyrenean desman. Aquatic Conserv: Mar Freshw Ecosyst 31, 1859–1872. https://doi.org/10.1002/aqc.3563

Gillet, F., Tiouchichine, M.-L., Galan, M., Blanc, F., Némoz, M., Aulagnier, S., Michaux, J.R., 2015. A new method to identify the endangered Pyrenean desman (*Galemys pyrenaicus*) and to study its diet, using next generation sequencing from faeces. Mammalian Biology 80, 505–509. https://doi.org/10.1016/j.mambio.2015.08.002

González-Esteban, J., Esnaola, A., Aihartza, J., 2018. A new sampling method to detect the Pyrenean desman (*Galemys pyrenaicus*). Hystrix It. J. Mamm. 29, 190–194. https://doi.org/10.4404/hystrix-00078-2018

González-Esteban, J., Villate, I., Castién, E., 2003. A comparison of methodologies used in the detection of the Pyrenean desman *Galemys pyrenaicus* (E. Geoffroy, 1811). Mammalian Biology 68, 387–390.

Griffith, B., Scott, J.M., Carpenter, J.W., Reed, C., 1989. Translocation as a Species Conservation Tool: Status and Strategy. Science 245, 477–480. https://doi.org/10.1126/science.245.4917.477

Quaglietta, L., 2021. IUCN Red List of Threatened Species: *Galemys pyrenaicus*. IUCN Red List of Threatened Species.

Walters, C.L., Collen, A., Lucas, T., Mroz, K., Sayer, C.A., Jones, K.E., 2013. Challenges of Using Bioacoustics to Globally Monitor Bats, in: Adams, R.A., Pedersen, S.C. (Eds.), Bat Evolution, Ecology, and Conservation. Springer, New York, NY, pp. 479–499. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-7397-8_23

7. Eskerrak eta oharrak

Eskerrak eman nahi dizkiet bereziki, ikerketa garaian 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.

Bitamina hidrosolubleak Euskal Herriko Mendiko Zaldia arrazako behorren esnean: Karakterizazioa eta edoskitzaroaren zeharreko eboluzioa

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

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

Laburpena

Bitaminak giza osasunerako ezinbestekoak diren konposatu organikoak dira. Esnea bitamina hidrosolubleen iturri ona da baina behor esnean dauden bitamina hidrosolubleak oso gutxi ikertu dira. Ikerketa honetan, Euskal Herriko Mendiko Zaldia arrazako behor esnean dauden hamar bitamina hidrosoluble karakterizatu dira lehenengo aldiz. Aztertutako behor esnea C, B_3, B_5 eta B_{12} bitaminetan da bereziki aberatsa. Edoskitzaroan zeharreko aldaketa esanguratsuak aurkitu dira B_3, B_5, B_6 eta B_{12} bitaminen edukietan. Maneiu sistemak (ustiategiak) eragin esanguratsua dauka B_2 eta B_3 bitaminen edukietan. Honek Euskal Herriko Mendiko Zaldiaren esnearen kalitatea balioztatzen du.

Hitz gakoak: Esnea, Euskal Herriko Mendiko Zaldia, C bitamina, B taldeko bitaminak, edoskitzaroa.

Abstract

Vitamins are essential organic compounds for human wellbeing. Milk is known to be an adequate source of water-soluble vitamins, but their presence in mare milk has very poorly been studied. In this study, ten water-soluble vitamins in mare milk from the autochthonous breed Basque Mountain Horse have been characterized for the first time. The milk studied was particularly rich in vitamins C, B_3, B_5, and B_{12}. Lactation stage had a significant effect on the content of vitamins B_3, B_5, B_6 and B_{12}. Management system (farm) significantly affected vitamin B_2 and B_3 levels. These results show that Basque Mountain Horse breed can provide a high quality milk.

Keywords: Milk, Basque Mountain Horse, C vitamin, B group vitamins, lactation stage.

1. Sarrera eta motibazioa

Hego Euskal Herrian, Euskal Herriko Mendiko Zaldia izeneko ekido arraza autoktonoa erabiltzen da moxal haragia ekoizteko. Batez ere sistema estentsibopean hazten den zaldi arraza da, non abeltzainek baliabide naturalak aprobetxatzen dituzten animaliak elikatu eta hazteko. Maneiu sistema honek ingurunea eta landa eremuak mantentzen laguntzen du (Fleurance et al., 2012). Gainera, Euskal Herriko Mendiko Zaldia desagertzeko arriskuan dagoen ekido arraza autoktonoa izanik, bere ekoizpenak euskal kultura babesten laguntzen du. Arraza honen iraunkortasuna sustatze aldera, ikerketa honetan moxal haragiarekin batera behor esnearen ekoizpena eta komertzializazioa proposatzen dira dibertsifikazio aukera bezala. Horretarako, jatorri zehatz honetako behor esnearen konposizioa sakon karakterizatzea ezinbestekoa da, sekula ekoiztu eta ikertu ez den elikagaia baita.

Behor esnea Erdialdeko Asian kontsumitzen da gehien bat, nahiz eta azken urteetan Europara hedatu den, batez ere Frantzia, Belgika, Austria, Herbehereak eta Alemaniara (Sheng eta Fang, 2009). Gaur egun, Euskal Herrian ez da behor esnerik komertzializatzen, baina badira estatu mailan behor esne liofilizatuarekin prestaturiko elikadura-osagarriak, behor esnearekin egindako produktu kosmetikoak eta behor esne izoztua saltzen duten bi enpresa txiki. Behorren errapeak txikiak direnez, esnearen ekoizpena mugatua da. Izan ere, behorrek egunean 12 L esne eman ditzakete gehienez, behiek 30 L baino gehiago eman ditzaketen bitartean (Doreau eta Martin-Rosset, 2022). Bestalde, behor esnea giza osasunarekin erlazionatutako elikagaia da, eta hainbat gaixotasun tratatzeko gaitasuna esleitzen zaio, hala nola, tuberkulosia, bihotz-gutxiegitasuna, ultzera peptikoak eta azaleko arazoak (Sheng eta Fang, 2009). Hau dela eta, behor esnea balio erantsi altuko produktuak egiteko erabili ohi da, esaterako, elikadura-osagarriak.

Behor esnearen konposizioa giza esneak duenaren oso antzekoa denez, jaioberri goiztiarrak elikatzeko ere erabili izan da (Doreau eta Martin-Rosset, 2002). Hala ere, behor esnearen konposizioa sakon ikertzeke dago oraindik. Konposizio orokorra (gantz, proteina, laktosa eta estraktu lehorraren edukiak) gehiago ikertu bada ere (Barreto et al., 2020; Doreau et al., 1990; Markiewicz-Kęszycka et al., 2013), beste konposatu espezifiko batzuen presentzia (mineralak,

bitaminak edo gantz-azidoak, esaterako) gutxi aztertu da gaurdaino, nahiz eta konposatu gako hauek esnearen propietate funtzionaletan parte hartu.

Bitaminak substantzia organiko esentzialak dira gizakiontzat, hau da, ezinbestekoak dira metabolismoaren funtzionamendurako baina giza gorputza ez da hauek sintetizatzeko gai. Hortaz, dieta da konposatu hauek lortzeko bide nagusia (Kamiloglu et al., 2021; Said, 2015). Bitaminak bi kategorietan sailkatu daitezke: hidrosolubleak edo uretan eta disolbatzaile polarretan disolbagarriak direnak, eta liposolubleak edo gantzetan eta disolbatzaile organikoetan disolbagarriak direnak. Bitamina hidrosolubleen artean, C bitamina (azido askorbikoa) eta B taldearen barruan sartzen diren hainbat bitamina daude. B bitamina taldean B_1 (tiamina), B_2 (erriboflabina), B_3 (niazina: azido nikotinikoa eta niazinamida formak biltzen dituen terminoa), B_5 (azido pantotenikoa), B_6 (piridoxina, piridoxala eta piridoxamina), B_7 (biotina), B_9 (azido folikoa) eta B_{12} (kobalamina) bitaminak daude (Kamiloglu et al., 2021; Said, 2015). Bitamina bakoitzak funtzio espezifiko bat badauka ere, orokorrean, giza organismoaren funtzionamendurako eta hazkuntza eta garapenerako ezinbestekoak dira, hainbat prozesu metaboliko eta fisiologikoetan parte hartzen dutelako (European Food Safety Authority, 2017; Kamiloglu et al., 2021; Said, 2015). Funtzio hauetaz gain, gaixotasun kroniko espezifikoak prebenitzeko duten gaitasunagatik (Kamiloglu et al., 2021) eta daukaten ahalmen antioxidatzaileagatik (Sinbad et al., 2019) bitaminak konposatu bioaktiboak kontsideratu daitezke. Bitamina hidrosolubleen iturri onak barazkiak eta frutak, haragia eta animalia organoak (gibela batez ere), lekaleak, zereal osoak, hurrak eta esnea eta esnekiak dira (Said, 2015). Kobalaminaren (B_{12} bitamina) kasuan, animalia jatorriko produktuak bereziki garrantzitsuak dira, mikroorganismoak baino ez baitira gai bitamina hori sintetizatzeko (animalietan, digestio sistemaren mikroorganismoek sintetizatzen dute, eta ehunetara – haragia eta esnea – pasatu daiteke), landareetan daukan presentzia oso txikia izanik (Ball, 2004).

2. Arloko egoera eta ikerketaren helburuak

Jakina da esnea eta esnekiak bitamina hidrosolubleen iturri ona direla, baina behor esnean dauden bitamina hidrosolubleak kuantifikatu dituzten lan oso gutxi daude, bitamina gutxi batzuk aztertuz, eta batzuek teknika ez oso zehatzak (teknika mikrobiologikoak, adibidez) erabiliz. Gainera, Euskal Herriko Mendiko Zaldia arrazako esnea sekula ez da analizatu.

Aurretik aipatutako guztia kontuan hartuta, ikerketa honen helburua Euskal Herriko Mendiko Zaldia arrazako behor esnearen bitamina hidrosolubleen profila karakterizatzea da. Gainera, edoskitzaroak eta ustiategian egindako erabilerak bitamina horien edukian izan dezaketen eragina ikertuko da. Behor esnean 10 bitamina aldi berean aztertu diren lehenengo aldia da, zehaztasun handiko teknika analitiko aurreratuak (HPLC) erabiliz.

3. Ikerketaren muina

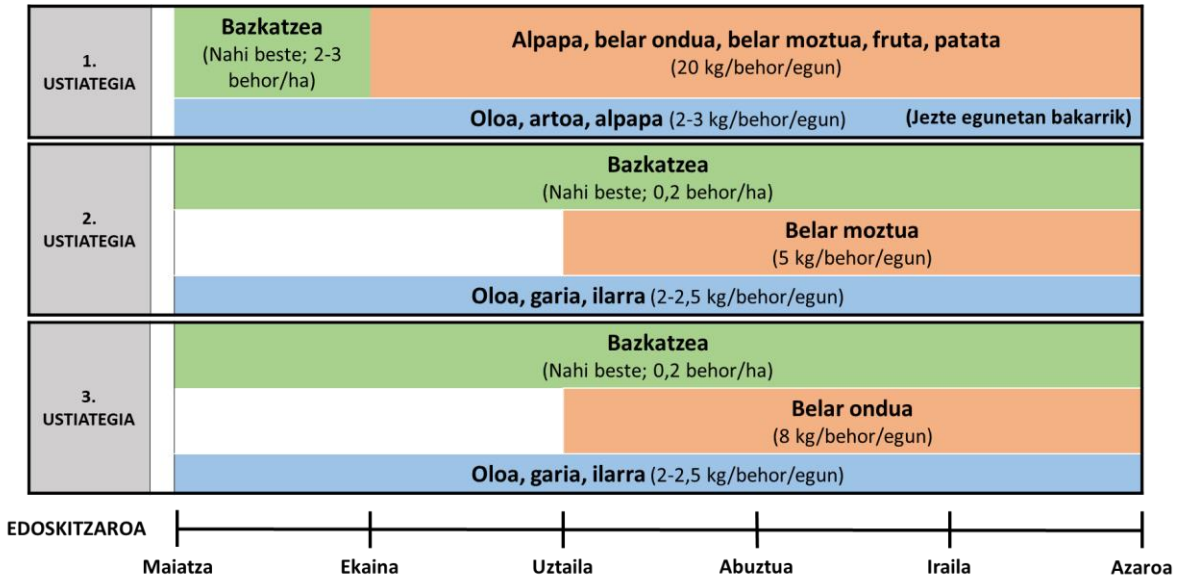
3.1 Materialak eta metodoak

Esne laginak Euskal Herriko Mendiko Zaldia hazten duten Arabako hiru abeltegitatik jaso ziren, 2021eko maiatza eta urri artean. Ikerketa honetarako 18 behor jetzi ziren, astean behin maiatzetik uztailera, eta hamalau egunean behin abuztutik urrira, guztira 310 lagin jasoz. Jarraitutako animalien ekoizpen sistema eta elikadura ezberdina izan zen abeltegi bakoitzean (1. irudia). 1. ustiategian, behorrek edoskitzaroaren lehenengo hilabetean baino ez zuten larrean bazkatu eta gero belar, fruta eta patata nahasketa batez elikatu ziren. Laginketa egunetan behorrek olo, arto eta alpapa nahasketa bat jan zuten jezte gelan. Abeltegi honetan jezte makina erabili zuten. Bestalde, 2. eta 3. ustiategietan elikadura sistema estentsiboagoa jarraitu zuten edoskitzaro osoan zehar belarra bazkatuz. Hala ere, uztailetik aurrera, eskuragarri zegoen belar eskasiagatik, belar moztuarekin (2. ustiategia) edo belar onduarekin (3. ustiategia) osatu zuten animalien dieta. 1. abeltegiaren antzera, behorrek olo, gari eta ilar nahasketa bat jan zuten jezte gelan, baina kasu honetan, laginketa eguna izan ala ez, behorrak egunero pasatu ziren jezte gelatik (behorrak prozesu horretara ohitzen joateko). Bi ustiategi hauetan behorrak eskuz jetzi ziren. Laginak hotzean mantendu ziren laborategira eraman arte. Gero, -80°C-tan kontserbatu ziren analisiak burutu arte.

Analisirako patroien artean, tiamina hidrokloruroa, erriboflabina eta nikotinamida Supelcon (St. Louis, EEBB) lortu ziren; kaltzio D-pantotenatoa, zianokobalamina, azido folikoa, azido L-askorbikoa, piridoxina hidrokloruroa, azido nikotinikoa eta piridoxal hidrokloruroa Sigma-Aldrichen (St. Louis, EEBB) lortu ziren.

Bitamina hidrosolubleen analisirako, Zafra-Gomez et al. (2006)-en metodoa jarraitu zen, aldaketa txiki batzuekin. Labur, esnea hauspeatze-soluzio batekin nahastu zen bitamina hidrosolubleak beste konposatu batzuetatik banantzeko. Zentrifugatu eta gero, bitamina hidrosolubleak zituen goiko fase urtsua jaso, nylonezko 0,2 µm-ko porositatea zuen filtrotik iragazi eta HPLC bialetan sartu zen. Konposatuen banaketa eta kuantifikaziorako, eraginkortasun altuko likido kromatografia, eta diodo ekorketa eta fluoreszentzia detektoreak (HPLC-FL-DAD) erabili ziren. Fluoreszentzia detektorearekin (FL) piridoxina eta piridoxala (B_6 bitamina, 290 nm-ko kitzikapen uhin-luzeran eta 410 nm-ko emisio uhin-luzeran), eta erriboflabina (B_2 bitamina, 400 nm-ko kitzikapen uhin-luzeran eta 520 nm-ko emisio uhin-luzeran) detektatu ziren. Diodo ekorketa detektorearekin (DAD) tiamina (B_1 bitamina, 245 nm-ko uhin-luzeran), niazina eta niazinamida (B_3 bitaminak, 261 nm-ko uhin-luzeran), azido pantotenikoa (B_5 bitamina, 195 nm-ko uhin-luzeran), azido folikoa eta azido askorbikoa (B_9 eta C bitaminak, hurrenez hurren, 282 nm-ko uhin-luzeran) eta zianokobalamina (B_{12} bitamina, 370 nm-ko uhin-luzeran) kuantifikatu ziren.

1. irudia. Hiru ustiategietako behorren elikadura edoskitzaroan zehar.



Analisi estatistikoa ANOVA Modelo Linear Mixtoarekin egin zen, IBM-SPSS software estatistikoa erabilita (28. bertsioa, New York, EEBB), non animalia bakoitza subjektu, ustiategia faktore finko eta edoskitzaroa errepikatutako neurketa faktore gisa kontsideratu ziren. Tratamendu estatistikorako, edoskitzaro osoa 14 egunetako tarteetan banandu zen, garai goiztiarrena erditu ondorengo 3-4 asteak eta beranduena erditu ondorengo 25-26 asteak kontsideratuz.

3.2 Emaitzak eta eztabaida

Behor esnean aurkitutako bitamina hidrosolubleen laburpena eta literaturatik ateratako behi eta giza esneen edukiekin konparaketa 1. taulan jaso dira. Behi eta giza esneetan bezala, behor esnean bitamina hidrosoluble ugariena azido askorbikoa (C bitamina) da. Behi eta behor esneetako C bitamina kopurua antzekoa da, baina giza esnean dagoena baino nabarmen baxuagoa. Edalontzi bat behor esnek (~250 mL) helduen eguneko beharren (HEB) % 6 ase egingo luke, eta behi esne edalontzi batek % 4, batez beste. Bigarren bitamina ugariena (hiru esne motetan) azido pantotenikoa (B_5 bitamina) da. Kasu honetan ere, behi eta behor esneetan dagoen kopurua antzekoa da, baina giza esnean dagoena baino altuagoa. Behor esne edalontzi batekin B_5 bitaminaren HEB-en % 17 beteko litzateke, eta behi esne edalontzi batekin % 19. Behor esnean, B_3 eta B_6 (piridoxala batik bat) bitaminen edukia nabarmena da, baina behi eta giza esneak bi bitamina hauetan aberatsagoak dira. Ikerketa honetako emaitzak kontuan hartuta, behor esne

edalontzi batek B_3 eta B_6 bitaminen HEB-en % 72 eta % 3,4 beteko luke, hurrenez hurren; behi esnearenak, aldiz, % 213 eta % 10, hurrenez hurren. Azkenik, behor esnean dauden bitamina hidrosoluble gutxiengoak erriboflabina (B_2 bitamina) eta kobalamina (B_{12} bitamina) dira, giza esnean bezala; behi esnean, aldiz, erriboflabina kopurua niazinarena baino handiagoa da. Behor esnean, B_2 bitamina edukia oso baxua da behi eta giza esneekin alderatuta. B_{12} bitamina edukia, ordea, nabarmen altuagoa da behor esnean (behi esnean baino 3 aldiz eta giza esnean baino 41 aldiz altuagoa). Behor esne edalontzi batek B_2 bitaminaren HEB-en % 0,3 asetzen duen bitartean, behi esneak % 31 asetzen du; baina B_{12} bitaminaren HEB-ak kontsideratuz gero, behor esneak % 103 asetzen du eta behi esneak aldiz % 30 bakarrik. Tiamina (B_1 bitamina) eta azido folikoa (B_9 bitamina) ez ziren behor esnean aurkitu. Behi eta giza esnearekin alderatuta eta HEB-ak kontuan izanda, behor esnea azido askorbikoan (C bitamina), niazinan (B_3 bitamina), azido pantotenikoan (B_5 bitamina) eta kobalaminan (B_{12} bitamina) aberatsa da.

1. taula. Behor esnean dauden bitamina hidrosolubleen edukia (µg/100 g esne), eta ustiategia, edoskitzaroa eta bien arteko interakzioaren eragina. Konparaketarako behi eta giza esnea (µg/100 mL esne) eta helduentzako eguneko bitamina beharrak (µg) ere jaso dira.

		ERAGINAREN ESANGURA					
BITAMINA	**BEHOR ESNEA**	**UST.**	**EDOSK.**	**UxE**	**BEHI ESNEA**	**GIZA ESNEA**	**HEB**
B_2 (erriboflabina)	1,36 ± 0,92 (0,127-5,46)	*	EA	EA	116-202	20-60	1300
B_3 (azido nikotinikoa)	11,0 ± 2,9 (8,54-27,8)	EA	*	EA	50-120 [A]	147-178 [A]	100 [A,C]
B_3 (niazinamida)	17,6 ± 11,8 (16,2-76,8)	**	***	EA			
B_5 (azido pantotenikoa)	334 ± 264 ($11,1\text{-}168\cdot10^1$)	EA	***	EA	260-490	184-270	5000
B_6 (piridoxala)	12,7 ± 5,4 (3,07-27,9)	EA	***	*	30-70 [B]	11-14 [B]	1300 [B]
B_6 (piridoxina)	4,73 ± 2,09 (2,83-25,8)	EA	EA	*			
B_{12} (kobalamina)	1,65 ± 0,19 (1,16-2,30)	EA	**	EA	0,27-0,70	0,03-0,05	4
C (azido askorbikoa)	$177\cdot10^1$ ± 663 ($918\text{-}464\cdot10^1$)	EA	EA	EA	300-2.300	3.500-10.000	80.000

Behor esnearen balioak bataz bestekoa ± desbiderapen estandarra bezala daude adierazita. Parentesi artean balio maximoa eta minimoa adierazi dira. Behi eta giza esneen balioak minimoa eta maximoaren arteko tartea bezala daude adierazita.

UST.: Ustiategia; **EDOSK.**: Edoskitzaroa; **UxE**: Ustiategiaren eta edoskitzaroaren arteko interakzioa; **HEB.**: Helduen eguneko beharrak; **EA.**: Ez adierazgarria ($P > 0,05$). *$P \leq 0,05$; **$P \leq 0,01$; ***$P \leq 0,001$.

[A] Azido nikotinikoa + niazinamida.

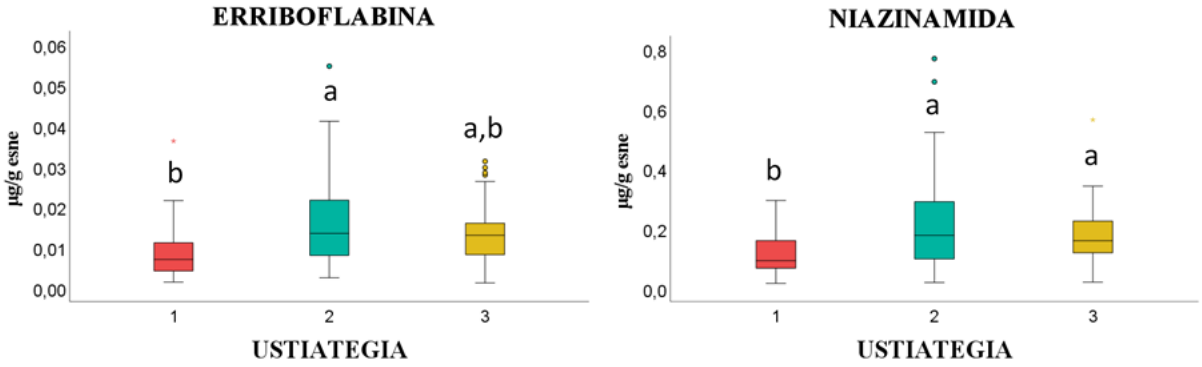
[B] Piridoxala + piridoxina.

[C] Eguneko beharrak 1,3 mg/MJ dira. Eguneko behar energetikoa 11,9 MJ/egun dela kontsideratu da (European Food Safety Authority, 2013).

Behi eta giza esneen bitamina edukiak Claeys et al. (2014)-tik hartu dira. Helduentzako eguneko beharren balioak EFSA-ko (European Food Safety Authority) bilatzaile interaktibotik (Webpage on a website references, d. g.) atera dira.

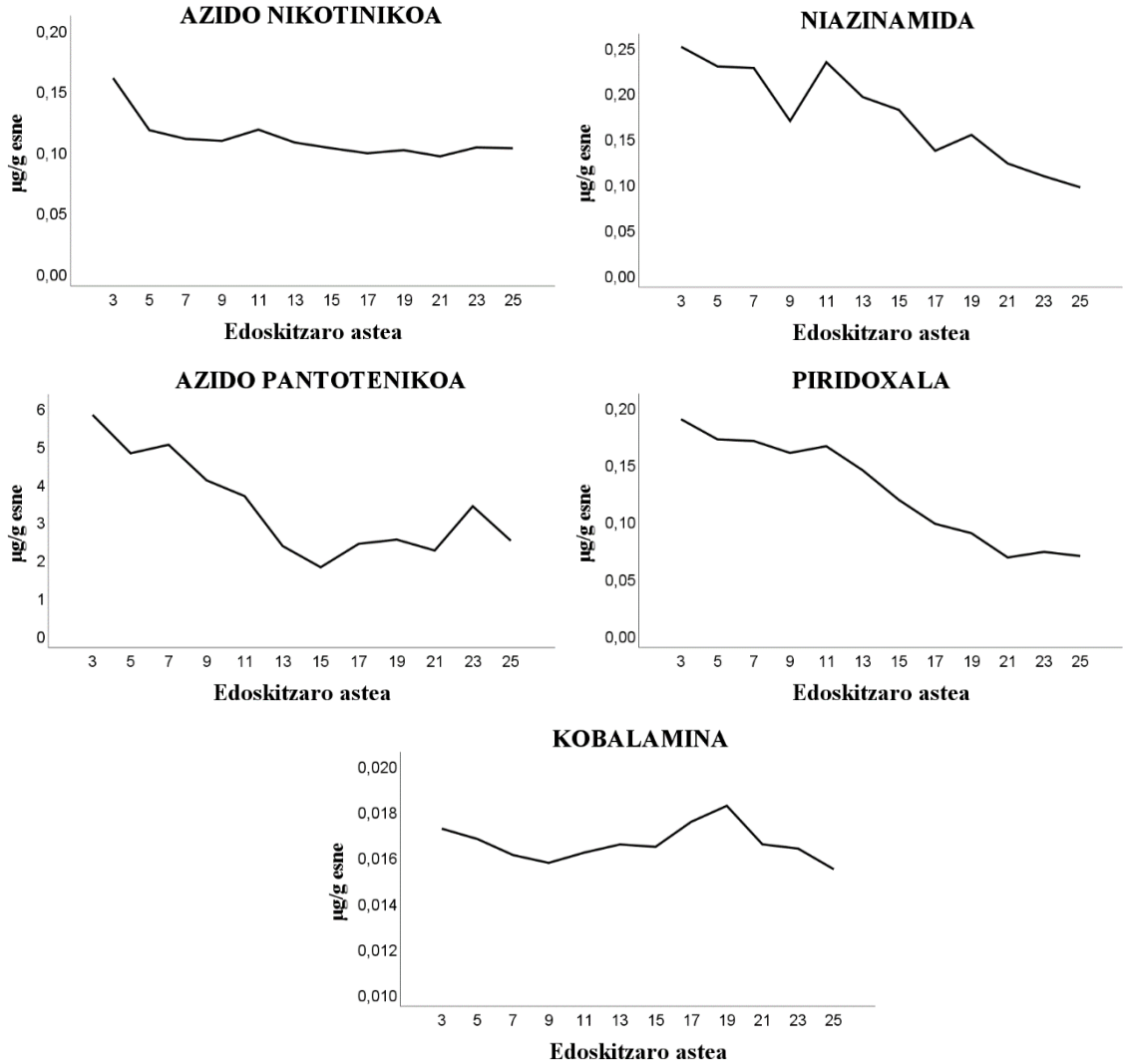
Ustiategiak eta edoskitzaroak behor esnearen bitamina hidrosolubleen edukian eragin esanguratsua dute. Zehazki, ustiategiak erriboflabina (B_2 bitamina) eta niazinamida (B_3 bitamina) edukietan dauka eragina, eta edoskitzaroak berriz azido nikotiniko eta niazinamidan (B_3 bitamina), azido pantotenikoan (B_5 bitamina), piridoxalean (B_6 bitamina) eta kobalaminan (B_{12} bitamina). Ustiategiaren eraginari dagokionez (2. irudia), larretan bazkatze denbora laburrena (1 hilabete) izan zuen abeltegiko (1. ustiategia) esneak bazkatze denbora luzea (edoskitzaro osoa) izandako abeltegien (2. eta 3. ustiategiak) esneak baino B_3 bitamina gutxiago dauka. B_2 bitamina kantitatea ere txikiagoa da bazkatze denbora laburreko ustiategiko (1. ustiategia) esnean bazkatze denbora luzea eta belar moztua erabili zuen abeltegiko (2. ustiategia) esnean baino.

2. irudia. Behor esneko erriboflabina (B_2 bitamina) eta niazinamida (B_3 bitamina) edukiak hiru ustiategietan.



a, b, a,b: Abeltegien arteko ezberdintasun esanguratsuak ($P \leq 0,05$).

3. irudia. Behor esneko bost bitamina hidrosolubleen eboluzioa edoskitzaroan zehar.



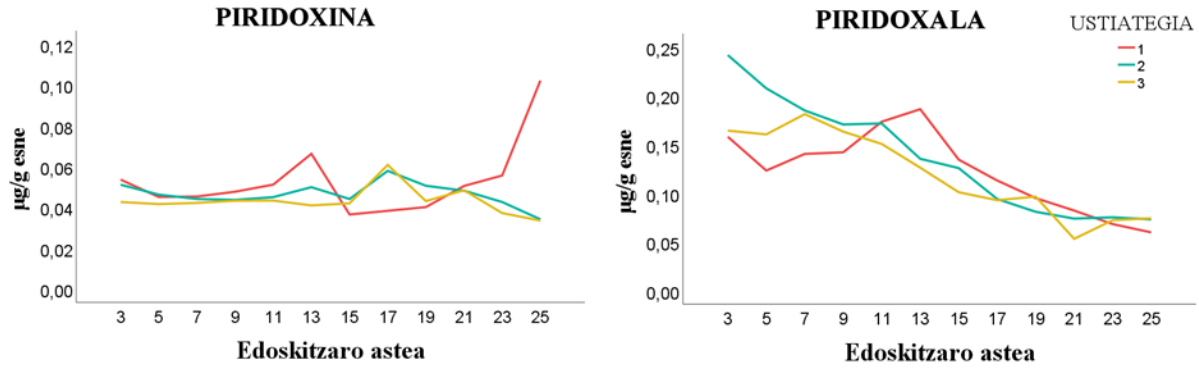
Edoskitzaroan zehar era esanguratsuan ($P \leq 0,05$; 1. taula) aldatu diren bitaminak 3. irudian jaso dira. Orokorrean, B_3, B_5 eta B_6 bitamina edukien jaitsiera ikusi da; B_{12} bitaminak, aldiz, bilakaera gorabeheratsua dauka. B_3 bitaminari dagokionez, bi formek (azido nikotinikoa eta niazinamida) eboluzio oso antzekoa dute, hala ere, niazinamidaren galera azido nikotinikoarena baino handiagoa da. B_5 bitaminaren galera 15. astera arte ematen da batez ere, eta gero edukiak egonkortzen dira.

B_6 bitaminaren bi formen kasuan (piridoxala eta piridoxina) aztertutako faktoreen arteko interakzioa estatistikoki esanguratsua da ($P \leq 0,05$; 1. taula). Izan ere, 1. ustiategiak eboluzio

ezberdina aurkezten du 2. eta 3. ustiategiekin alderatuta (4. irudia). Ustiategien arteko animalia elikadurak kontuan izanda eta lan honen diseinu esperimentalagatik egiaztatu ezin bada ere, baliteke maneiu sistemak bi forma bitaminiko hauen eboluzioan eragitea.

Behor esnean dauden bitamina hidrosolubleak kuantifikatu dituzten lanak oso gutxi dira, hortaz, arlo nahiko ezezaguna da. Beste zaldi arrazen behor esnean egindako ikerketetan lan honetan baino B_2 bitamina (10-25 µg/100 mL esne) eta B_6 bitamina (piridoxina; 20-39 µg/100 mL esne) eduki altuagoak aurkitu dira (Navrátilová et al., 2020; Teichert et al., 2021). Aitzitik, C bitaminaren (1.720-1.909 µg/100 mL edo g esne; Csapó et al., 1995; Teichert et al., 2021) eta B_{12} bitaminaren (2 µg/100 mL esne; Teichert et al., 2021) balio antzekoak deskribatu dira. Ikerketa honetan ez bezala, beste autore batzuek B_1 bitamina kuantifikatu dute behor esnean (Navrátilová et al., 2020). Guk dakigula, ikerketa bat baino ez dago edoskitzaroan zehar bitamina hidrosoluble batzuen (B_1, B_2 eta B_6 bitaminak) jarraipena egin duena (Navrátilová et al., 2020). Aipatutako ikerketa horretan, autoreek edoskitzaroan zehar B_6 bitaminan (piridoxina) aldaketa esanguratsua aurkitu zuten (balio altuenak edoskitzaro erdialdean). Euskal Herriko Mendiko Zaldia arrazako behor esnean, piridoxinan izan beharrean, piridoxal edukian aurkitu zen aldaketa esanguratsua (edukiaren murrizketa), 11. astetik aurrera beherakada nabariarekin. Lan honekin, behor esnean dauden bitamina hidrosolubleen edukia edoskitzaroarekin batera murrizten dela frogatu da lehenengo aldiz. Hau bat dator gantz, proteina eta mineral edukietan gertatzen den murrizketarekin (Doreau eta Martin-Rosset, 2022; Summer et al., 2004).

4. irudia. Behor esneko B_6 bitaminaren (bi formen) eboluzioa edoskitzaroan zehar eta ustiategiaren arabera.



Egun, animaliaren dietak esnearen bitamina hidrosolubleen profilean daukan eragina ez da oso ezaguna. Hala ere, badaude behi esnean egindako ikerketa gutxi batzuk dietak esnearen B_2 eta B_3 (niazinamida) bitaminen edukian eragina daukala frogatu dutenak. Magan et al. (2020)-ek B_3 bitamina eduki altuagoak eta B_2 bitamina eduki baxuagoak aurkitu zituzten pentsuekin elikatutako behi esnean belarrarekin elikatutako behi esnean baino; erriboflabinan aurkitutako ezberdintasun horiek lan honekin bat datoz. Bestalde, Shingfield et al. (2005)-ek B_2 bitamina gutxiago aurkitu zuten belar moztuarekin elikatutako behien esnean pentsu edo belar onduarekin elikatutako behien esnean baino. Behor esnean egindako antzeko ikerketarik ez da aurkitu, baina lan honetako abeltegi komertzial bakoitzaren maneiua kontutan hartuta, argi geratu da behorren elikadurak eragin zuzena izan duela bitamina hidrosolubleen profilean.

4. Ondorioak

Euskal Herriko Mendiko Zaldia arrazako behor esnea azido askorbikoan (C bitamina), niazinan (B_3 bitamina), azido pantotenikoan (B_5 bitamina) eta kobalaminan (B_{12} bitamina) aberatsa da, giza osasunerako kalitatezko produktua dela aditzera emanez. Edoskitzaroarekin batera, bitaminen edukian aldaketa esanguratsuak gertatzen dira, murrizketa orokorra hain zuzen. Gainera, jatorrizko ustiategiaren maneiu sistemak eragin esanguratsua dauka erriboflabina (B_2 bitamina) eta niazinamida (B_3 bitamina) edukietan.

Honekin guztiarekin, maneiu (erdi-)estentsiboan oinarritutako Euskal Herriko Mendiko Zaldiaren ekoizpenaren dibertsifikazioa interesgarria izan daitekeela ondorioztatu daiteke, bai arraza autoktonoaren bai Euskal Herriko abeltzaintza estentsiboaren iraunkortasunari lagunduz.

5. Etorkizunerako planteatzen den norabidea

Esnearen kalitatea ebaluatzeko ezinbestekoa da bere konposizioa sakon ezagutzea. Gainera, funtzio biologikoa daukaten konposatuak identifikatuz gero, esneak giza osasunean dauzkan onurak ezagutzea eta zientifikoki demostratzea ahalbidetuko da. Horregatik, lan honetatik abiatuta, Euskal Herriko Mendiko Zaldia arrazako esnearen karakterizazio sakona egin eta bere propietate funtzionalak frogatu behar dira, elikagai honen balioespena sustatzeko. Hau da, hain zuzen, lan hau barne hartzen duen Doktorego Tesiaren helburu nagusia.

6. Erreferentziak

Ball, G. F. (2004): *Vitamins: Their role in the human body*, Blackwell Publishing, Oxford, Erresuma Batua.

Barreto, Í M., Urbano, S. A., Oliveira, C. A., Macêdo, C. S., Borba, L. H., Chags, B. M., & Rangel, A. H. (2020). Chemical composition and lipid profile of mare colostrum and milk of the quarter horse breed. *PLOS One*, *15*(9), e0238921.

Claeys, W. L., Verraes, C., Cardoen, S., De Block, J., Huyghebaert, A., Raes, K., Dewettinck, K., & Herman, L. (2014). Consumption of raw or heated milk from different species: An evaluation of the nutritional and potential health benefits. *Food Control, 42*(1), 188-201.

Csapó, J., Stefler, J., Martin, T. G., Makray, S., & Csapó-Kiss, Z. (1995). Composition of mares' colostrum and milk. Fat content, fatty acid composition and vitamin content. *International Dairy Journal, 5*(4), 393-402.

Doreau, M., & Martin-Rosset, W. (2002). Dairy animals: Horse. In: *Encyclopedia of Dairy Sciences*, Academic Press, Londres, Erresuma Batua.

Doreau, M., Boulot, S., Barlet, J., & Patureau-Mirand, P. (1990). Yield and composition of milk from lactating mares: Effect of lactation stage and individual differences. *Journal of Dairy Research, 57*(4), 449-454.

European Food Safety Authority. (2013). Scientific opinion on dietary reference values for energy. *EFSA Journal, 11*(1), 3005 artikulua.

European Food Safety Authority. (2017). Dietary reference values for nutrients Summary Report. *EFSA supporting publication, 14*(12), e15121.

Fleurance, G., Edouard, N., Collas, C., Duncan, P., Farruggia, A., Baumont, R., Lecomte, T., & Dumont, B. (2012). How do horses graze pastures and affect the diversity of grassland ecosystems? In: *Forages and Grazing in Horse Nutrition*, Wageningen Academic Publishers, Wageningen, Herbehereak.

Kamiloglu, S., Tomas, M., Ozdal, T., Yolci-Omeroglu, P., & Capanoglu, E. (2021). Bioactive component analysis. In: *Innovative food analysis*, Academic Press, Londres, Erresuma Batua.

Magan, J. B., O'Callaghan, T. F., Zheng, J., Zhang, L., Mandal, R., Hennessy, D., Fenelon, M. A., Wishart, D. S., Kelly, A. L., & McCarthy, N. A. (2020). Effect of diet on the vitamin B profile of bovine milk-based protein ingredients. *Foods, 9*(5), 578 artikulua.

Markiewicz-Kęszycka, M., Wójtowski, J., Kuczyńska, B., Puppel, K., Czyżak-Runowska, G., Bagnicka, E., Strzałkowska, N., Jóźwik, A., & Krzyżewski, J. (2013). Chemical composition and whey protein fraction of late lactation mares' milk. *International Dairy Journal*, *31*(2), 62-64.

Navrátilová, P., Borkovcová, I., Kaniová, L., Dluhošová, S., & Zachovalová, H. (2020). The content of selected vitamins and iodine in mare's milk. *Acta Veterinaria Brno, 88*(4), 473-480.

Said, H. M. (2015). Water-soluble vitamins. In: *Nutrition for the Primary Care Provider*, Karger Publishers, Basilea, Suitza.

Sheng, Q., & Fang, X. (2009). Bioactive components in mare milk. In: *Bioactive components in milk and dairy products*, Wiley-Blackwell, Iowa, EEBB.

Shingfield, K. J., Salo-Väänänen, P., Pahkala, E., Toivonen, V., Jaakkola, S., Piironen, V., & Huhtanen, P. (2005). Effect of forage conservation method, concentrate level and propylene glycol on the fatty acid composition and vitamin content of cows' milk. *Journal of Dairy Research, 72*(3), 349-361.

Sinbad, O. O., Folorunsho, A. A., Olabisi, O. L., Ayoola, O. A., & Temitope, E. J. (2019). Vitamins as antioxidants. *Journal of Food Science and Nutrition Research, 2*(3), 214-235.

Summer, A., Sabbioni, A., Formaggioni, P., & Mariani, P. (2004). Trend in ash and mineral element content of milk from Haflinger nursing mares throughout six lactation months. *Livestock Production Science, 88*(1-2), 55-62.

Teichert, J., Cais-Sokolińska, D., Bielska, P., Danków, R., Chudy, S., Kaczyński, Ł K., & Biegalski, J. (2021). Milk fermentation affects amino acid and fatty acid profile of mare milk from Polish Coldblood mares. *International Dairy Journal, 121*(1), 105137.

Webpage on a website references. (d. g.). Https://multimedia.efsa.europa.eu. Berreskuratua 2023ko urtarrilaren 1ean, https://multimedia.efsa.europa.eu/drvs/index.htm-tik

Zafra-Gómez, A., Garballo, A., Morales, J. C., & García-Ayuso, L. E. (2006). Simultaneous determination of eight water-soluble vitamins in supplemented foods by liquid chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 54*(13), 4531-4536.

7. Eskerrak eta oharrak

Autoreek Eusko Jaurlaritza eskertzen dute proiektu (KK-2019/00034 BIOTASMA; 00015-COO2019-30 BEHOR ESNE) eta ikerketa-talde kontsolidatuen (IT944-16 eta IT1568-22) bidezko finantzaketagatik. A. Blanco-Doval-ek Eusko Jaurlaritzako Hezkuntza Saila eskertzen du doktoretza aurreko dirulaguntzagatik. Lan hau A. Blanco-Doval-en doktorego tesiaren parte da.

Polimeroak sortzeko behar diren molekulen sintesia neurrira egindako biokatalizatzaileak erabiliz

Ainhoa Maiz-Iginitz[1], Elena Gabirondo[1], Daniel Andres-Sanz[2], Fernando Lopez-Gallego[2], Haritz Sardon[1]

1 POLYMAT, Kimikako fakultatea, Euskal Herriko Unibertsitatea UPV/EHU, Manuel Lardizabal pasealekua 3, 20018, Donostia, Espainia

2 CIC biomaGUNE, "Center for Cooperative Research in Biomaterials", Miramon pasealekua 182, Donostia, Espainia

**amaiz@cicbiomagune.es*

Laburpena

Polimeroen industria geldialdirik gabe hazi da azken hamarkadetan, funtsezkoa bihurtu baita gure bizitzan. Ditugun polimero moten artean, polihidroxialkanoatoak propietate bikainak erakutsi dituzte, eta gainera bio-oinarrituak eta biodegradagarriak dira. Polimero hori lortzeko, proiektu honetan bide sintetiko berri bat bilatzen ari gara, β-zetoester batetik abiatua. Konposatu hori asimetrikoki erreduzitzen dute entzimek, β-hidroxiesterra lortzeko. Konposatu honetatik polihidroxialkanoato motako materialak ekoizteko gai izango gara.

Abstract

Polymer industry has grown non-stop in the last decades, since it has become essential in our lives. Between the different types of polymers that we have, polyhydroxyalkanoate type polymers have shown excellent properties, and furthermore they are bio-based and biodegradable. In order to obtain this polymer, in this project we are trying a new synthetic path started from a β-ketoester. This compound was asymmetrically reducted by enzymes to obtain β-hydroxyesters. This β-hydroxyesters will be able to produce polyhydroxyalkanoate type materials.

1. Sarrera eta motibazioa

Material ezberdinen ekoizpenak eta prozesaketak onura asko ekarri dizkio gaur egungo gizarteari, eta plastikoa material horietako bat da. Gaur egun hainbat aplikaziotan erabiltzen dira plastikoak, ezinbesteko bihurtu direlarik. Plastiko mota ezberdinak daude, eta lortu ditzakegun propietateak era askotarikoak dira. Orokorrean, plastiko hauek petrolioan oinarritutakoak dira, beraz, ez dira material berriztagarriak. Hori aldatzeko alternatibak bilatzen ari da zientzia, hain zuzen ere polimeroen alorra. Material berriztagarriak aztertzen ari da plastikoak sintetizatzeko. Iturri berriztagarritakoak izateaz gain, material hauek, bio-oinarrituak izan daitezke. Bio-oinarritutako materiala organismo bizidunetatik eratorritako substantziekin egindako materiala da. Bio-oinarritutako polimero bat PHB-a da, poli-3-hidroxibutiratoa. Polimero hau poliester termoplastiko bat da, polihidroxialkanoatoen (PHA) taldekoa. Maurice Lemoignek aurkitu zuen PHB-a 1925ean. (Gabirondo et al., 2020)

Polimero hau sintetizatzeko metodo nagusia mikroorganismoetatik da. Horretarako, bakterio mota batzuk ingurune kontrolatu batean jartzen dira, non nitrogeno, fosforo edo oxigeno kopurua mugatua den, baina karbono iturria gehiegizkoa. Hau gertatzean, bakterio hauek PHB polimeroa sintetizatzen dute, eta zelularen barruan metatzen dituzte granulo moduan. Baina lortutako polimeroaren pisu molekularra eta propietateak kontrolatzea zaila da. (McAdam et al., 2020)

Bestalde, PHB-a biodegradagarria da, biodegradagarriak diren materialak, mikroorganismoen jardueraren ondorioz degradazio jasaten dute molekula sinple edo bakunagoak bilakatuz. PHBaren kasuan 2 astetan pisuaren %60a galdu dezake. Propietate honek oso interesgarria bilakatzen du material hau. PHB-aren kasuan, polimeroa hidrolisi bidez depolimerizatu daiteke, ondorioz polimeroa bere eraikuntza-bloke molekularretan apurtzen da azido 3-hidroxibuturikoa lortuz. Horrez gain, polimero honek hesi propietate bikainak ditu, ondorioz ezaugarri hauek oso polimero interesgarrian bilakatzen dute PHB-a. Proiektu honetan, β-hidroxi ester bat sintetizatuko

dugu, PHB polimeroa lortzeko. Horretarako, biokatalisia eta polimeroen zientzia nahastuko ditugu, polimero jasangarri bat lortzeko. (Suzuki et al., 2021)

2. Arloko egoera eta ikerketaren helburuak

Esan bezala, PHB polimeroaren unitate errepikakorra β-hidroxi azido bat da. Hauek sintetizatzeko prozedura desberdinak erabil daitezke, baina erreakzio hauen enantioselektibitatea nabarmen alda daiteke. Aplikazio batzuetarako enantiopurutasuna oso esanguratsua da, hala nola, elikagai-osagarrietarako, farmazia-produktuetarako, kosmetikoetarako, eta beste produktu kimiko fin batzuetarako. (Nakamura et al., 2003)

β-hidroxi azidoen sintesi kimikoa lan neketsua da, horretarako metal astunak erabiltzen dira katalizatzaile bezala, hauek toxikoak izanik. Erreakzioek baldintza gogorrak behar dituzte tenperatura altuekin. Gainera, urrats askoko prozesuak dira, bitartekari eta taldea babesleak erabiltzera behartzen dutenak. Ondorioz, azpiproduktu asko sortzen dira erreakzio hauetan. Horrez gain, erreakzio hauen enantioselektibitatea ez da oso handia. (Spengler et al., 2013)

Bestalde, β-hidroxi azidoak sintetizatzeko biokatalisian oinarritutako erreakzioak erabil daitezke. Honek abantaila handiak eskaintzen ditu sintesi kimikoarekin alderatuz. Biokatalisian, sistema bizidunak edo horien zatiak erabiltzen dira erreakzio kimikoak bizkortzeko, hau da katalizatzaile gisa erabiltzen dira. Entzimak oso erabiliak dira biokatalisian, beraien estrukturari esker konposatu organikoetan eraldaketa kimikoak egiteko gai direlako. Gainera, hainbat abantaila eskaintzen dizkigute; enantiopurutasun altuko produktuak lortzeko aukera ematen dute, gainera erreproduzigarriak dira eta erabili ondoren erraz deskonposa daitezke ingurunean. Horrez gain, entzimekin egindako erreakzioetan baldintza leunak erabiltzen dira eta erreaktibo arriskutsuak ez dira beharrezkoak.

Baina biokatalisiak bere alde txarrak dakartza, alde batetik eskalagarritasun zaila, kostuak altuak direla medio. Gainera, produktuen purifikazioa beharrezkoa da eta espazioa eta denboraren errendimenduak ez dira handiak. Erabiltzen diren erreaktiboen kontzentrazioak baxua izan behar du eta erreakzio-denbora luzeak behar dira. Honen arrazoia entzimaren egonkortasuna da. Entzimak ingurune zehatz batzuetan ondo funtzionatzen dute, baina baldintzak aldatzean, beraien aktibitatea galtzen hasten dira. Desabantaila hau gainditzeko, entzima hauek kimikaren bidez hobetzen dira. Horretarako, entzima hauek inmobilizatu egiten dira erreakzio kimikoak erabiliz edo tratamentu espezifikoren bat egiten zaio entzimen egitura egonkortzeko. (Schmid et al 2001)

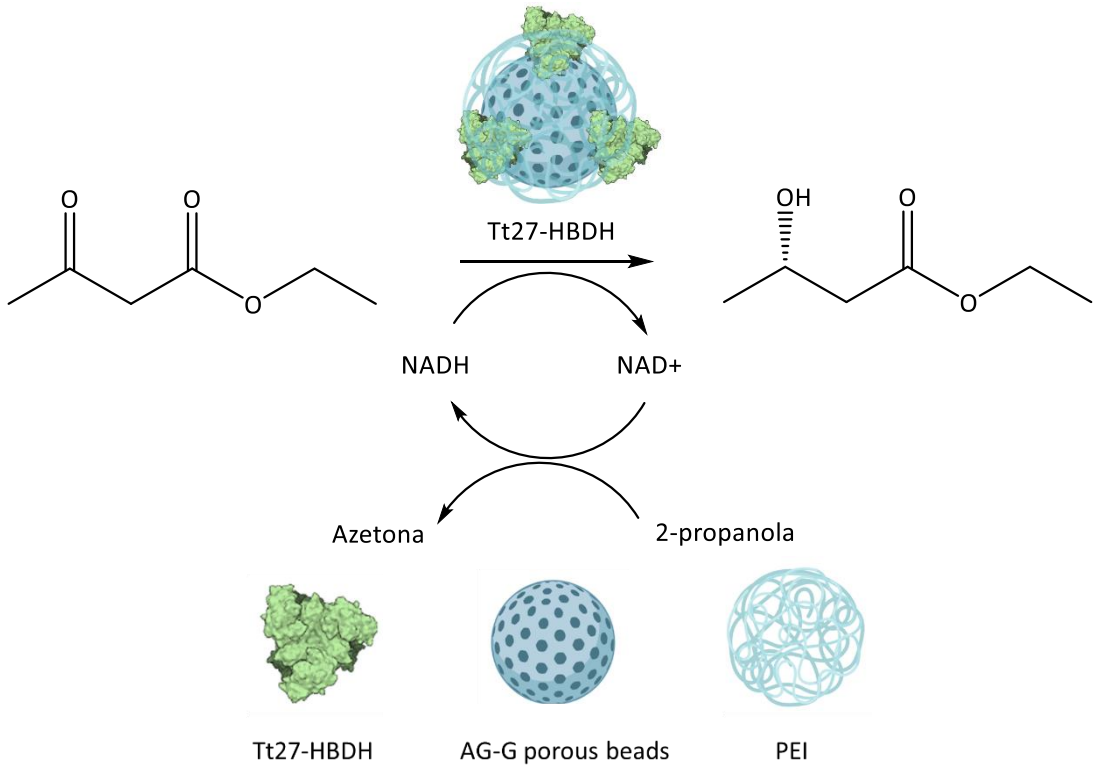
Beraz, inmobilizatutako entzimak erabiliz gero, entzimen selektibitate bikainak posible egiten du monomero kiralen sintesia. Molekula kiralak interesgarriak dira polimeroen zientziarako, eman ditzazketen propietate bereziengatik. Proiektu honetan jada deskribatuta dagoen biokatalizatzaile bat erabiltzen da enantiopurua den hidroxi ester bat sintetizatzeko. Molekula hau polimeroen zientziarako aztertzen ari gara, polihidroxialkanoatoen taldeko polimeroak lortzeko.

3. Ikerketaren muina

Sarreran esan bezala, interes handikoak dira hidroxi azido kiralak polimeroen zientzian. Hauen sinterirako, entzima batekin hasten gara, non β–zetoester bat erreduzitzen dugun β–hidroxiester bat lortzeko. Horretarako Tt27-HBDH entzima erabiltzen da, entzima hau thermus thermophilus taldekoa da, (S)-3-hydroxybutyryl-CoA deshidrogenasa bat. Entzima hau NAD(P)H mendekoa da, horrek esan nahi du, entzima mota honek erreakzioa egiteko NAD(PH) (nicotinamide adenine dinucleotide) molekula behar duela. Gainera, entzima honekin lortutako produktuen enantiopurutasuna oso altua da, %99 baino gehiagokoa.

Hala ere, lehen aipatu dugun bezala, entzima gehienen arazoa beraien egonkortasuna da. Hau hobetzeko, entzima immobilizatua erabiliko dugu. Entzima honentzat erabiliko dugun inmobilizazio-protokoloa poroak dituzten agarosa partikulekin da. Agarosa talde glioxilikoekin aktibatzen da, eta ondoren polietileniminaz estaltzen da guztia. Tratamentu honekin oraindik eta egonkortasun handiagoa lortzen da. (Orrego et al., 2021)

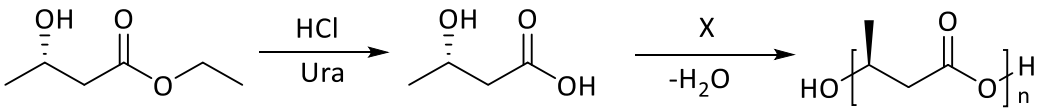
1. irudia. β-zetoesterraren erredukzioa biokatalizatzailearekin



Biokatalizatzaile honekin lortutako produktua etil-3-(S)-hidroxibutanoatoa da. Biokatalizatzailearen erabileraren ondorioz, produktua laborategiko eskalan lortzeko gaitasuna daukagu. Lortutako produktu honen kiralitatea ustiatu nahi dugu polimeroen kimikan. Horretarako hainbat erreakzio bide aztertu ditugu.

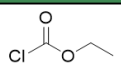
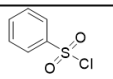
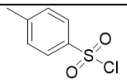
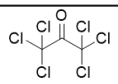
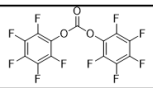
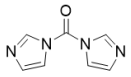
Lehenengo erreakzio bidean etil-3-(S)-hidroxibutanoatoa polimerizatzeko, lehenik hidrolizatu egin genuen, hidrolisi azidoaz, hidroxi azido bat lortuz. Ondoren, polimerizatzen saiatu gara polikondentsazioz, konposatu ezberdinak probatuz. Polikondentsazioan, kondentsazio bat gertatzen da molekulen artean, molekula txikiak askatuz, adibidez ura, metanola, azido klorhidrikoa edo bestelako konposatuak askatuz. Monomeroak edo oligomeroak elkarren artean erreakzionatzen joaten dira polimero kateak eratuz.

2. irudia. Polimerizazio erreakzioaren eskema



Hidrolisian sortutako hidroxi azidoa beta posizioan duenez alkohol taldea, konposatu ez-egonkorra da. Alkohol talde hau eliminatzean sortzen den lotura bikoitza konjokatua baitago azidoarekin. Horren ondorioz, sortzen den produktua eliminazioz oso egonkorra da. Beraz, hau ez gertatzeko polimerizazioan konposatu oso erreaktiboak erabili genituen, polimerizazioa erraztua egoteko. Probatutako konposatu guztiak kondizio berdinetan erabili genituen, 24 orduz, 50 ºC-tan eta x erreaktiboaren 1,2 ekibalente botaz. Hurrengo taulan agertzen dira aztertutako konposatuak eta lortutako etekinak H-RMN-a erabiliz.

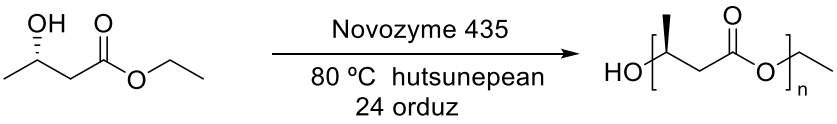
1. taula. Aztertutako molekulak eta lortutako etekinak

Molecule	Name	Yield (%)
	Ethyl chloroformate	45,4
	Benzenesulfonyl chloride	83,5
	Tosyl chloride	82,1
	Thionyl chloride	91,9
	Methanesulfonyl chloride	85,1
	Hexacloroacetone	24,2
	Bis(pentafluorophenyl) carbonate	18,2
	1,1'-Carbonyldiimidazole	36,3

Tionilo kloruro konposatuak ematen zituen polimeroaren sintesian etekin (yield) handienak, beraz bertan lortutako konposatua MALDI-TOF proba egiteko erabili genuen. Teknika honekin, molekulak ionizatzen dira matrize bat erabiliz, molekulen pisu molekularrak lortzeko. Tionilo kloruroarekin lortutako produktuarekin 700-900 g/mol tarteko pisu molekularrak lortu genituen. Beraz, 7-8 molekula lotzen dira elkarren artean kate bakoitzean.

Beste erreakzio bide bat ere aztertzen ari gara, non zuzenean etil-3-(S)-hidroxibutanoatoa polimerizatzen saiatzen garen polikondentsazioz. Bertan, konposatu hau ez dugu hidrolizatzen, eta hidroxi esterretik hasten gara. Lehenengo saiakeran, novozyme 435 biokatalizatzaile komertziala erabili dugu polimerizaziorako. Biokatalizatzaile honek *candida antartica*-tik lortutako lipasa b entzima dauka, poli metil metakrilatozko partikuletan inmobilizatuta.

3. irudia. Polimerizazio erreakzioaren eskema



Erreakzioa, 80 ºC-tan egin zen 24 orduz hutsunepean, disolbatzailerik gabe, eta biokatalizatzailea %10 gehitu zen, erreaktiboarekin alderatuz pisutan. Bertan lortutako produktua MALDI-TOF frogaz aztertu zen, eta 600-800 g/mol tarteko pisu molekularrak lortu ziren. Oraindik polimerizazio kondizio gehiago aztertu behar dira novozyme 435 biokatalizatzailearekin, baina etorkizun ona izan dezakeela dirudi. Horrez gain, beste katalizatzaile batzuk aztertzen ari gara gaur egun, novozyme 435 biokatalizatzailearekin alderatzeko. Horretarako, katalizatzaile oso ezberdinak probatzen ari gara, entzimatikoak, organikoak eta organometalikoak. Oraindik katalizatzaile ezberdinentzat kondizio egokienak bilatzen ari gara erreakziorako, ondoren beraien artean alderatzeko. Egin ditugun saiakeretan lortutako etekinak eta pisu molekularrak lehenengo erreakzio bidearen antzekoak dira. Lehenengo erreakzio bidean erabiltzen diren erreaktiboak arriskutsuagoak eta toxikoagoak dira, bigarren erreakzio bidearekin alderatuz. Beraz erreakzio hauek aztertzen jarraituko dugu.

4. Ondorioak

Proiektu honetan, molekula kiral bat sintetizatu da, biokatalizatzaile bat erabiliz. Lortutako produktuak purutasun eta enantiopurutasun handia dauka, eta polimeroen zientzian erabiltzeko saiakerak egin dira.

Beraz, polikondentsatzen saiatu gara bi bide ezberdin erabiliz. Alde batetik, hidroxi esterra hidrolizatu eta lortutako hidroxi azidotik polimerizatzen saiatu gara. Horretarako hainbat konposatu aztertu genituen, non tionilo kloruroak eman zituen emaitzarik onenak. Erabilitako konposatuak toxikoak eta ez jasangarriak ziren.

Bestalde, hidroxi esterretik polimerizazioak aztertzen ari gara, katalizatzaile ezberdinak erabiliz. Egindako saikeretan ikusi dezakegu bi bideetatik lortutako etekina eta pisu molekularra alderagarriak direla. Beraz, bigarren erreakzio bide hau jasangarriagoa denez, katalizatzaile egokiena bilatzen saiatuko gara

5. Etorkizunerako planteatzen den norabidea

Etorkizunean, esan bezala katalizatzaile ezberdinak aztertzen jarraituko dugu. Horretarako mota ezberdinetako katalizatzaileak aukeratzen ari gara. Katalizatzaile hauetako batzuk entzimatikoak dira, beste batzuk organikoak, eta beste batzuk organometalikoak. Katalizatzaile mota bakoitzerako kondiziorik egokienak bilatzen ari gara erreakzio honetarako. Eta behin kondizioak izanda, katalizatzaileak beraien artean alderatuko ditugu.

6. Erreferentziak

Gabirondo, E., Sangroniz, A., Etxeberria, A., Torres-Giner, S. eta Sardon, H. (2020) Poly(hydroxy acids) derived from the self-condensation of hydroxy acids: From polymerization to end-oflife options. Polym. Chem. 11, 4861–4874. https://doi.org/10.1039/D0PY00088D

McAdam, B., Brennan Fournet, M., McDonald, P., eta Mojicevic, M. (2020). Production of Polyhydroxybutyrate (PHB) and Factors Impacting Its Chemical and Mechanical Characteristics. Polymers. 12(12), 2908. https://doi.org/10.3390/polym12122908

Nakamura, K., Yamanaka, R., Matsuda, T. eta Harada, T. (2003) Recent developments in asymmetric reduction of ketones with biocatalysts. TETRAHEDRON: ASYMMETRY 14, 2659–2681. https://doi.org/10.1016/S0957-4166(03)00526-3

Orrego, A. H. et al.(2021) Self-sufficient asymmetric reduction of β-ketoesters catalysed by a novel and robust thermophilic alcohol dehydrogenase co-immobilised with NADH. Catal. Sci. Technol. 11, 3217–3230. https://doi.org/10.1039/D1CY00268F

Schmid, A. et al. (2001) Industrial biocatalysis today and tomorrow. Nature vol. 409 258–268. https://doi.org/10.1038/35051736

Spengler, J,. eta Albericio, F,. (2013) Asymmetric Synthesis of α-Unsubstituted β-Hydroxy Acids. Advances in Organic Synthesis. 3-35 (33) https://doi.org/10.2174/978160805475611304000 3

Suzuki, M., Tachibana, Y., eta Kasuya, K. (2021) Biodegradability of poly(3-hydroxyalkanoate) and poly(ε-caprolactone) via biological carbon cycles in marine environments. Polym J. 53, 47–66. https://doi.org/10.1038/s41428-020-00396-5

Kimika dinamikoa 3D argi ultramore bidezko fotopolimerizazioan aplikatua

Jon Ayestarán[1], Robert Aguirresarobe[1], Itxaso Calafel[1], Haritz Sardon[1].

[1]POLYMAT, Kimikako fakultatea, Euskal Herriko Unibertsitatea UPV/EHU,

Manuel Lardizabal pasealekua 3, 20018, Donostia, Espainia

jon.ayestaran@polymat.eu

Laburpena

Sare kobalente moldagarriak, material termoegonkor eta termoplastikoen abantailak batzen dituzten polimero familia berri bat kontsideratzen da. Funtsean, egitura erretikulatuak dira, baina kateetan zehar lotura dinamikoak dauzkatenez, material hauek birprozesatzeko eta auto erreparatzeko gaitasuna dute. Lan honetan, eragozpen esteriko handiko ureetan oinarritutako sare kobalente moldagarriak sintetizatu dira, argi ultramore bidezko fotopolimerizazio inprimagailua erreaktore gisa erabiliz.

Fabrikazio gehigarriaren kontzeptuaren barnean, garrantzitsuenetako bat argi ultramore bidezko fotopolimerizaioa da. 3D teknika honetan, piezak geruzaz geruza lortzen dira, erretxina likido bat argi ultramorearen bidez solido bilakatuz. Teknika honetan erabiltzen diren erretxinek, lotura bikoitzak eduki behar dituzte haien egituretan, beraz, material hauen sintesian, lotura dinamikoak gehitzeaz gain, lotura bikoitzak ere gehitu dira inprimatu ahal izateko. Inpresioaren ostean, lortutako materialen dinamismoa aztertu da, baita birprozesatzeko eta auto erreparatzeko gaitasuna ere.

Hitz gakoak: Fabrikazio gehigarria, Sare dinamikoak, Eragozpen esteriko handiko ureak, Fotopolimerizazioa.

Abstract

Covalent adaptable networks are considered as a new family of polymers that combine advantages of thermoplastic and thermoset materials. Basically, they are crosslinked structures, but as they have dynamic bonds within its structure, these materials are able to be reprocessed and self-heal. In this work, an adaptive covalent network, based on bulky urea bonding has been synthetized, using the Vat photopolymerization printer as a reactor.

Among the techniques included in the concept of Additive Manufacturing, one of the most important techniques is VAT photopolymerization. In this 3D printing technique, the objects are printed layer by layer, converting a liquid resin into a solid material by means of ultraviolet light. The resins that are used in this technique must contain double bonds within their structure, that is why, in the synthesis of these materials, apart of adding dynamic bonds, double bonds has also been added in order to 3D print them. After the printing of the materials their dynamism has been confirmed, as well as their capacity for self-healing and reprocessing.

Keywords: Additive Manufacturing, Dynamic Networks, Hindered Ureas, photopolymerization.

1. Sarrera eta motibazioa

Polimeroak, monomero izeneko unitate errepikakor baten edo gehiagoren lotura kobalentez sortutako makromolekulak dira. Iturri naturalekoak izan daitezke, baina baita sintetikoak ere. Gaur egun, gure gizarteko funtsezko atal bat dira eta hainbat esparrutan aurki daitezke, hala nola;

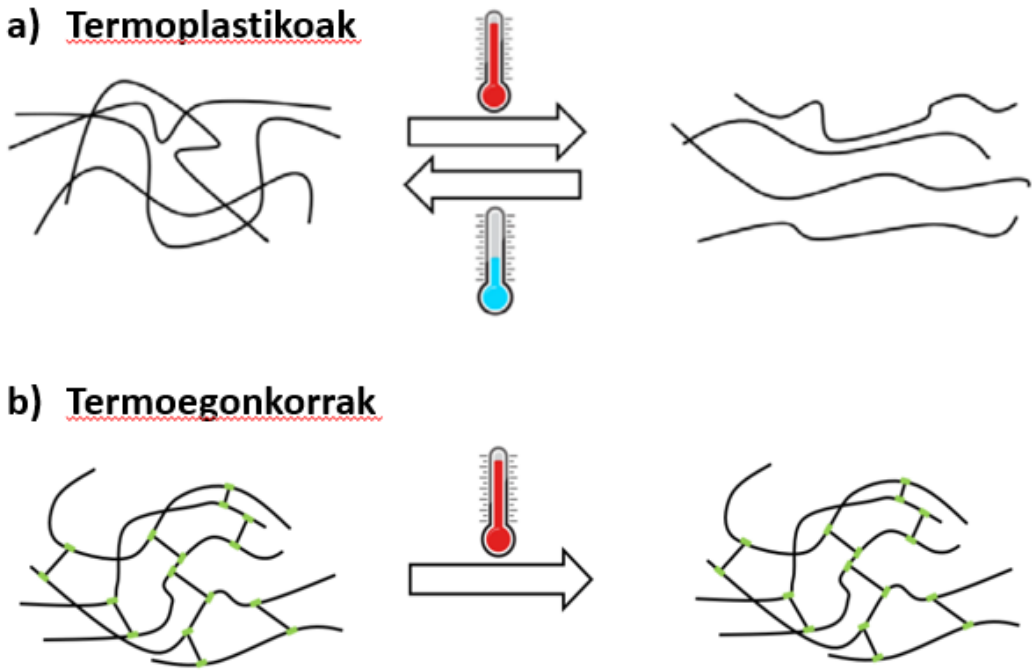
medikuntzan (Chiellini, 1983), eraikuntzan (Goncalves eta Margarido, 2015), elektronikan (Sadasivuni et al., 1986), autogintzan (Lyu eta Choi, 2015) eta beste hainbat sektoreetan, beraz ez dago inolako zalantzarik hauen garrantziaren inguruan. Polimeroak klasifikatzeko era arrunt bat, termoplastiko eta termoegonkor gisa bereiztea da.

Polimero termoplastiko bat, luzera finitua duten kate polimerikoz osatuta dago. Material mota hauek malguak eta moldagarriak bihurtzen dira tenperatura zehatz baten gainetik berotzean eta solidotu egiten dira berriro hoztean 1a) Irudian ikusten den bezala Termoplastikoetan, kate polimerikoak indar intermolekularren bidez lotzen dira elkar, eta indar hauek ahuldu egiten dira tenperatura igoz gero, likido likatsu batean bilakatuz. Egoera honetan, termoplastikoek forma berriak har ditzakete eta beraz oso erabiliak dira injekzio, konpresio edo estrusio bidezko prozesaketa tekniketan (Shenoy eta D.R. Saini, 1996).

Aipatutako urtzeko eta forma berria hartzeko gaitasunagatik, termoplastikoen ezaugarri garrantzitsuenetariko bat, gehienetan birprozesagarriak direla da. Termoplastiko arruntenen artean, polietilenoa, polikarbonatoa, polibinil kloruroa, polipropilenoa, poliestirenoa edota polietilen tereftalatoa daude, besteak beste.

Bestalde, termoegonkorrak prepolimero likido bat gurutzatuz lortzen dira eta sare disolbaezin eta urtuezinak dira (Horie et al., 2004). Gurutzapen hau beroarekin edo erradiazio egokiarekin lortzen da, eta katalizatzaileak eta presio altuak lagungarriak izan daitezke. Aipatu bezala, gurutzapen handia lortzen da kate polimerikoen artean, sare disolbaezin eta urtuezina sortuz, 1b) Irudian ikusten den bezala.

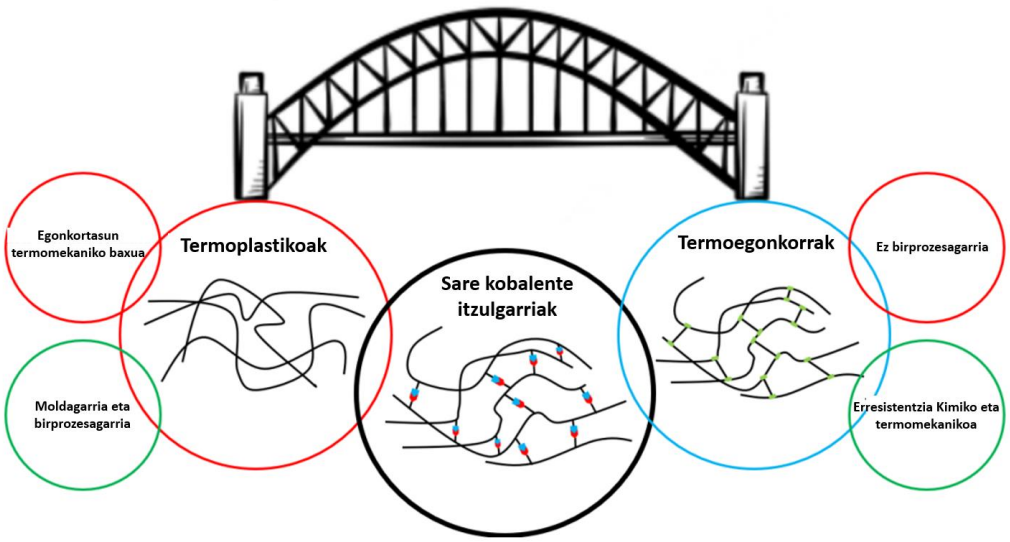
1.Irudia: a) Termoplastiko baten tenperaturarekiko aldaketa estrukturalaren irudikapena. b) Termoegonkor baten egiturak tenperaturarekiko duen erresistentziaren irudikapena.



Beraz, polimero termoegonkorrak, hiru dimentsioko sare egitura dutela eta, ezin dira birziklatu birprozesaketa bitartez. Hala ere, egitura honek erresistentzia kimiko, estabilitate termiko eta sendotasun estruktural apartak ematen dizkio materialari, eta beraz, oso erabiliak dira sektore aeroespazialean, besteak beste. Termoegonkor arruntenen artean, epoxi erretxinak eta erretxina fenolikoak aurkitzen dira (Pascault eta Williams, 2012). Aipatutako guztiagatik, material termoegonkorrak garrantzi handikoak dira, baina birziklatu ahal ez izana arazo larria da eta beraz gaur egun komunitate zientifikoa konponbideak bilatzen ari da, kimika jasangarri baten bila (Ayre, 2018; García et al., 2014; La Rosa et al., 2018). Bilaketa honetan, polimero familia berri

bat jaio da, termoegonkorrek dituzten propietate mekaniko eta erresistentzia kimiko onekin, baina birprozesaketaren atea irekita utziz. Material berri hauek sare kobalente moldagarri bezala ezagutzen dira, eta Bowman eta Kloxinek (Bowman eta Kloxin, 2012) definitu zuten moduan, material gurutzatuak dira baina sarean zehar nahikoa lotura kobalente itzulgarri dituzte aplikatutako estimulu bati, kimikoki erantzuteko. Beraz, sare kobalente itzulgarriak, termoplastiko eta termoegonkorren tarteko zerbait dira, 2.Irudian azaltzen den bezala.

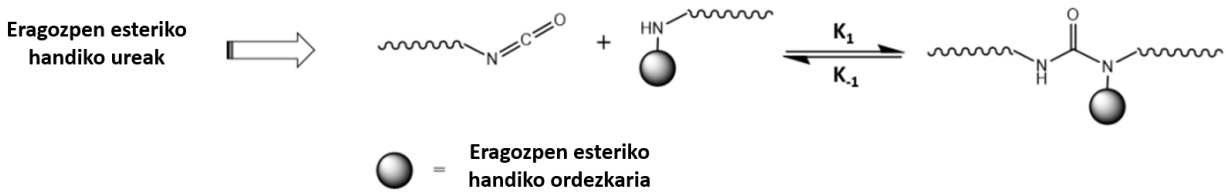
2.Irudia: Sare kobalente moldagarriak, termoplastiko eta termoegonkorren arteko zubi gisa.



Ikusten den bezala sare kobalente itzulgarriak, termoegonkor eta termoplastikoen arteko zubi gisa jokatzen dute. Ezaugarri berezi horiek, sarea osatzen duten lotura itzulgarriek ematen dituzte. Lotura itzulgarri edo dinamikoak hauek, “ireki” eta “itxi” daitezkeen loturak dira.

Kasu honetan, erabili den lotura dinamikoa eragozpen esteriko handiko ureetan oinarritutakoa da 3.Irudian azaltzen den bezala.

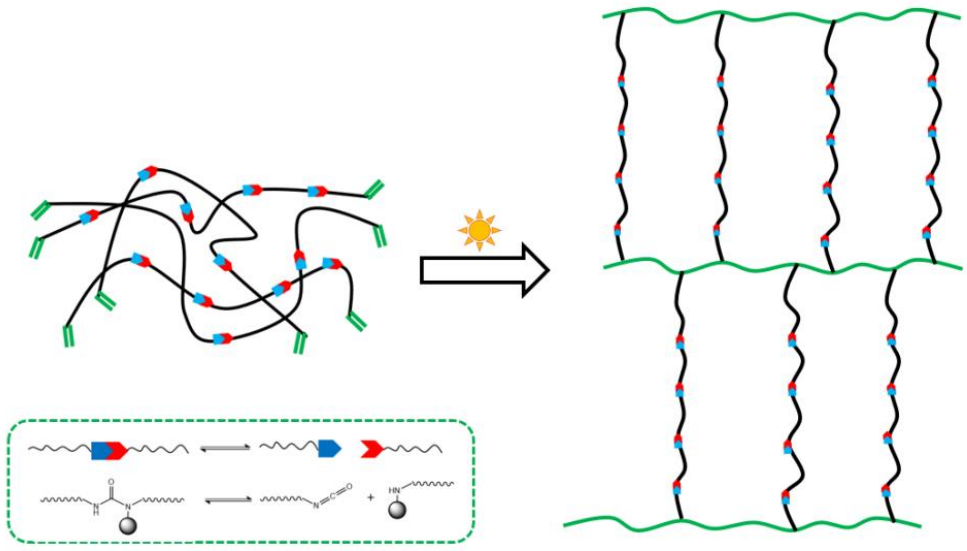
3.Irudia: Eragozpen esteriko handiko ureen lotura dinamikoaren irudikapena.



Erreakzio honetan, eragozpen esteriko handiko ordezkari bat duen amina bat erabiltzen ba da, sortzen den urearen amida lotura ahuldu egiten da eta ireki/itxi oreka bat lortzen da.

Beraz, lan honetan, lotura dinamiko hau kate polimerikoetan zehar sartu da, 3D inpresio bitartez sare kobalente itzulgarri bat lortzeko, 4.Irudian ikusten den bezala.

4.Irudia: 3D inpresioan ematen den gurutzapen erreakzioaren irudikapena.



2. Arloko egoera eta ikerketaren helburuak

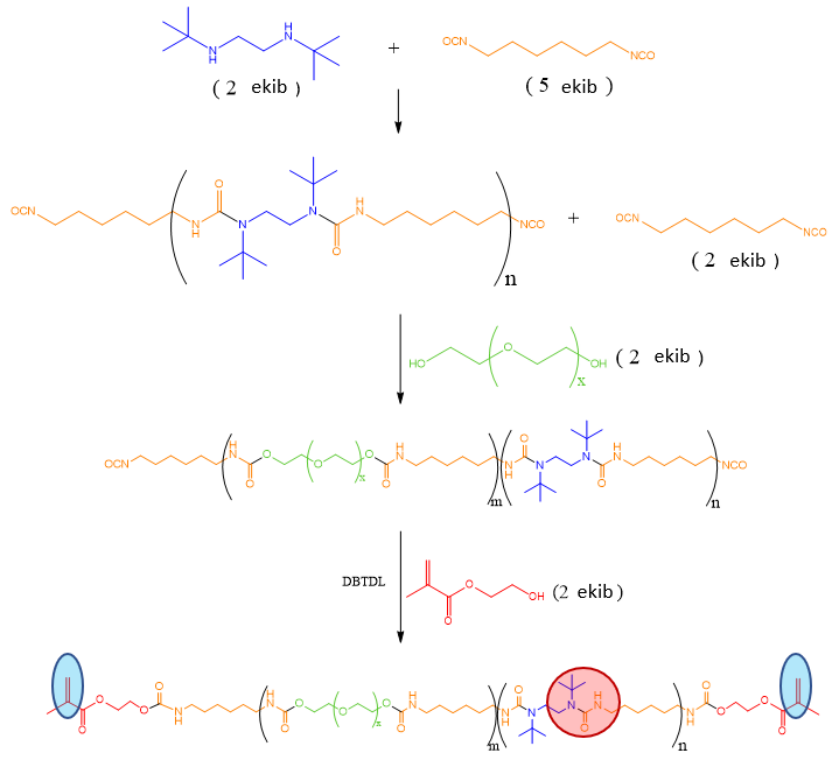
Lan honek, aipatutako sare kobalente itzulgarriak, gaur egun asko hazten ari den 3D inpresio munduarekin lotzea du helburu nagusi. Fabrikazio gehigarria eta kimika dinamikoa lotzeak oso interes handia du kimika jasangarri baterantz hurbiltzeko. Horretarako, eragozpen esteriko handiko ureetan oinarritutako erretxina batzuk argi ultramore bidezko fotopolimerizazio inprimagailuan sartzen dira eta inpresioaren ondoren, bilatzen den sare dinamikoa lortzen da. Gero, sare honen birprozesatze gaitasuna eta auto erreparatzeko gaitasuna ikertzen da. Helburu nagusi hau lortzeko, beste hainbat azpi helburu zehaztu dira:

- Erretxina inprimagarriak sintetizatzea, bai lotura dinamikoekin, baita inpresiorako behar diren lotura bikoitzekin ere.
- Erretxina inprimatu aurretik sakontasunean karakterizatu, egitura kimikoa, propietate termikoak eta erreologikoak ezagutzeko.
- Inprimatzeko gaitasuna erreologia bidez aztertu, horretarako foto erreologia neurketak erabiliz.
- Inpresio ostean lortutako materialak karakterizatu, haien dinamismoa eta propietate termomekanikoak ondo ezagutzeko.

3. Ikerketaren muina

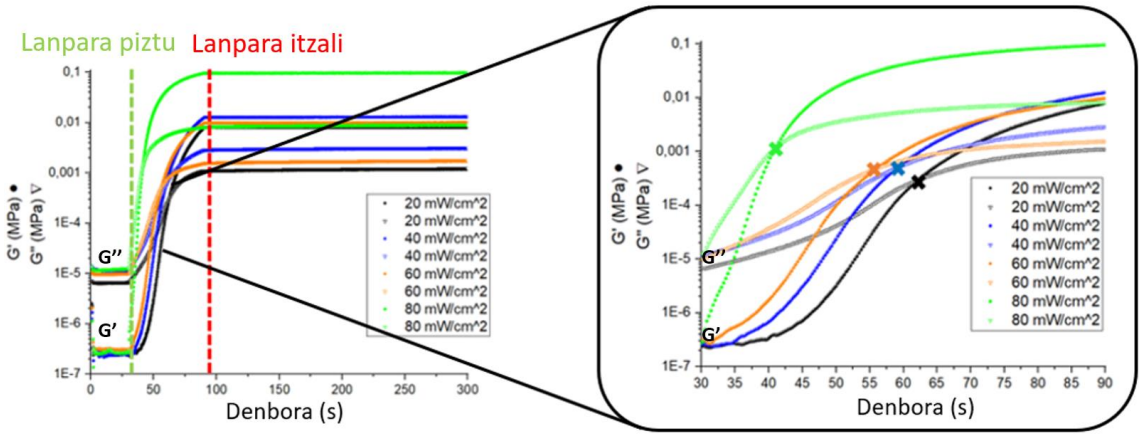
Lehenik eta behin erretxina sintetizatu da. Horretarako, 5.Irudian ikusten den bezala, lehen etapa batean hexametilen diisozianatoa eta N,N’-Di-tert-butiletilendiamina nahastu dira. Gero, bigarren etapan polietilenglikola gehitu da katea luzatzeko eta azkenik, hidroxietil metakrilatoa eta DBTDL katalizatzailea gehitu dira, inpresiorako behar diren lotura bikoitzak gehitzeko.

5.Irudia: Eragozpen esteriko handiko ureak dituen erretxinaren sintesia.



Beraz ikusten den bezala, 3 etapa ostean, gure erretxina prest dago, lotura dinamikoarekin (gorriz borobildua) eta lotura bikoitzekin (urdinez borobildua). Behin hau edukita, hurrengo pausoa inprimatzea da, hala ere, lehenengo karakterizazio erreologiko bat egin behar zaio, inprimagarria den edo ez jakiteko. Horretarako, lehenengo neurketa foto erreologikoak egin ziren, 6.Irudian ikusten den bezala.

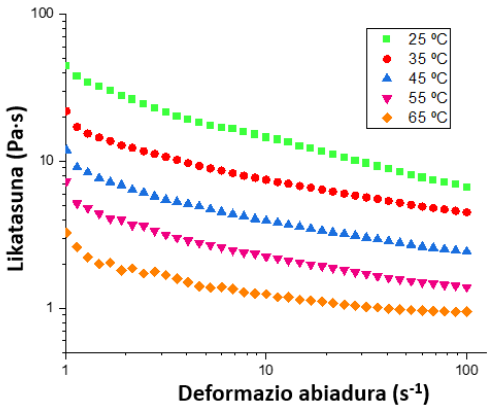
6.Irudia: Eragozpen esteriko handiko ureetan oinarritutako erretxinen neurketa foto erreologikoak.



Neurketa hauetan G’ eta G’’ moduluak aztertzen dira denborarekiko, eta ultramore argia piztean modulu hauen aldaketa ikus daiteke. G’>G’’ izateak materiala solidoa dela esan nahi du eta kontrakoak, G’’>G’ materiala likidoa dela. Beraz hasieran materiala, erretxina, likidoa da, baina behin ultramore argia piztuta, moduluak elkar gurutzatzen dira, materiala solidoa dela, eta 3D sarea osatu dela adieraziz. Irudian ikusten da, intentsitatea igo heinean, materiala azkarrago solidotzen dela. Baina orokorrean solidotze zinetikak nahiko azkarrak dira material honetan. Beraz, inprimatzerako orduan, hau kontuan edukiko da, irradiazio denbora baxuak jarriz.

Bestalde, erretxinaren likatasuna ere neurtu da, 7.Irudian azaltzen den bezala:

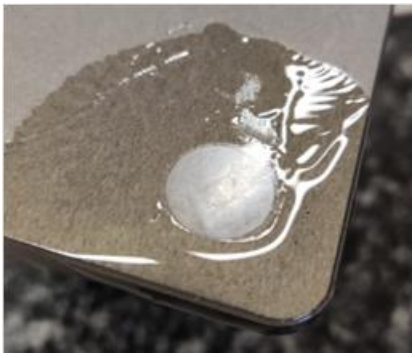
7.Irudia: Eragozpen esteriko handiko ureetan oinarritutako erretxinen likatasunaren neurketa tenperatura ezberdinetan.



Ikusten den bezala, likatasuna egokia da inpresio prozesurako tenperatura guztietan. Gutxi gora behera esan daiteke 30 Pa·s baino balio altuagoak ez dira oso aproposak inprimatzeko, eta 0,2 Pa·s baino balio baxuagoak ezta. Kasu honetan tenperatura guztietan likatasuna aproposa denez, 25 gradutan inprimatzea erabaki da.

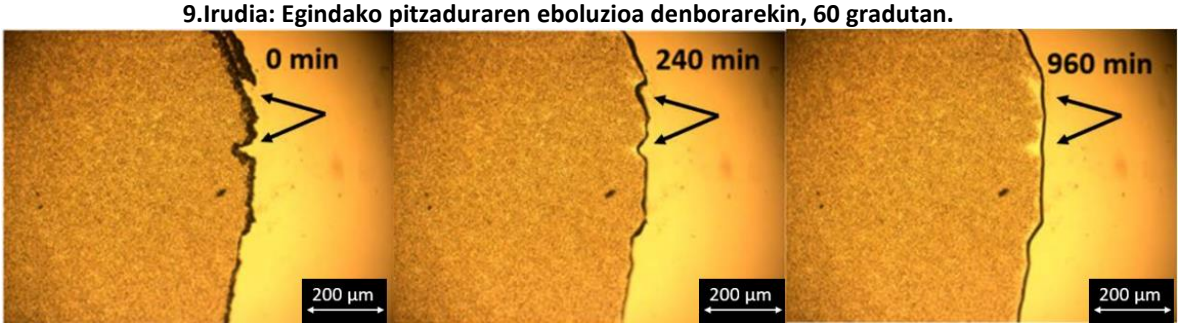
Guzti hau kontutan edukita, materiala inprimatu egin da, eta 8.Irudian lortutako emaitza bat erakusten da.

8.Irudia: Eragozpen esteriko handiko ureetan oinarritutako erretxina inprimatu ondoren lortutako diskoa.



Azkenik, inpresio ostean lortutako sareen dinamismoa aztertu da. Horretarako laginari pitzadura bat egin zaio eta mikroskopio optikoaren bidez, 60 gradutan materialak pitzadura hori konpontzeko gaitasuna aztertu da, 9.Irudian ikusten den bezala.

9.Irudia: Egindako pitzaduraren eboluzioa denborarekin, 60 gradutan.



Ikusten den bezala, denborarekin pitzadura guztiz ixten da, materiala konponduz, beraz, esan daiteke materialak auto konpontzeko gaitasuna duela lotura dinamikoei esker.

Horrez gain, materiala birprozesatzen ere saiatu gara prentsa beroaren bitartez. Horretarako saretutako film bat zati txikitan moztu da, eta gero prentsa beroan sartu da 160 ºC-tan 15 minutuz, 10.Irudian erakusten den bezala.

10.Irudia: Eragozpen esteriko handiko ureen birprozesaketarako jarraitu den prozeduraren adierazpena.

Ikus daiteke, prentsatik pasa eta gero, berriz ere film bat lortzen dela, beraz material honek birprozesatzeko gaitasuna duela esan daiteke.

4. Ondorioak

Ondorio bezala, esan daiteke 3D fotopolimerizaio bidez inprimagarriak diren sare kobalente itzulgarriak lortu direla. Horretarako, sintesian lotura dinamikoak eta bikoitzak sartu behar izan zaizkio erretxinari, gero inprimatu ahal izateko. Behin materiala erreologikoki aztertu ondoren, inprimatu eta sare kobalente itzulgarriak lortu dira. Azkenik sare kobalente hauen dinamismoa aztertu da eta argi eta garbi ikusi da sare hauek birprozesagarriak eta auto erreparagarriak direla.

5. Etorkizunerako planteatzen den norabidea

Lan hau hasiera besterik ez da, eta beraz ba dago etorkizunerako zer egin. Lehenik eta behin, material hauek baterietan elektrolito gisa erabiltzeko asmoa dago, erreparagarriak direla eta, bizitza luzeago bat emateko. Bestalde, material hauen birziklagarritasuna sakonago aztertzeko asmoa dago, baita hasierako materialarekin konparatzeko ideia ere. Azkenik, 3D inprimagailu bidez objektu konplexuagoak lortzea ere erronkatzat har genezake.

6. Erreferentziak

Ayre, D. (2018). Technology advancing polymers and polymer composites towards sustainability: A review. *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry*, *13*, 108–112. https://doi.org/10.1016/j.cogsc.2018.06.018

Bowman, C. N., eta Kloxin, C. J. (2012). Covalent adaptable networks: Reversible bond

structures incorporated in polymer networks. *Angewandte Chemie - International Edition*, *51*(18), 4272–4274. https://doi.org/10.1002/anie.201200708

Chiellini, E. (1983). *Polymers in medicine*.

García, J. M., Jones, G. O., Virwani, K., McCloskey, B. D., Boday, D. J., Ter Huurne, G. M., Horn, H. W., Coady, D. J., Bintaleb, A. M., Alabdulrahman, A. M. S., Alsewailem, F., Almegren, H. A. A., eta Hedrick, J. L. (2014). Recyclable, strong thermosets and organogels via paraformaldehyde condensation with diamines. *Science*, *344*(6185), 732–735. https://doi.org/10.1126/science.1251484

Goncalves, M. C., eta Margarido, F. (2015). Materials for construction and civil engineering. In *Materials for Construction and Civil Engineering: Science, Processing, and Design*. https://doi.org/10.1007/978-3-319-08236-3_2

Horie, K., Fox, R. B., He, J., Hess, M., Kahovec, J., Kitayama, T., Kubisa, P., Mormann, W., Stepto, R. F. T., Tabak, D., Wilks, E. S., eta Work, W. J. (2004). *DEFINITIONS OF TERMS RELATING TO REACTIONS OF POLYMERS AND TO FUNCTIONAL POLYMERIC*. *76*(4), 889–906.

La Rosa, A. D., Blanco, I., Banatao, D. R., Pastine, S. J., Björklund, A., eta Cicala, G. (2018). Innovative chemical process for recycling thermosets cured with recyclamines® by converting bio-epoxy composites in reusable thermoplastic-an LCA study. *Materials*, *11*(3). https://doi.org/10.3390/ma11030353

Lyu, M. Y., eta Choi, T. G. (2015). Research trends in polymer materials for use in lightweight vehicles. *International Journal of Precision Engineering and Manufacturing*, *16*(1), 213–220. https://doi.org/10.1007/s12541-015-0029-x

Pascault, J.-P., eta Williams, R. J. J. (2012). Overview of thermosets: structure, properties and processing for advanced applications. *Thermosets*, 3–27. https://doi.org/10.1533/9780857097637.1.3

Sadasivuni, K. K., Hegazy, S. M., Aly, Aa. A. M. A., Waseem, S., eta Karthik, K. (1986). Polymers in Electronics. In *Advanced Materials and Processes* (Vol. 2, Issue 6). INC. https://doi.org/10.1016/b978-0-12-816808-0.00011-1

Shenoy, A. V., eta D.R. Saini. (1996). *Thermoplastic melt rhelogy and processing*. CRC Press. https://doi.org/10.1201/9781482295535

7. Eskerrak eta oharrak

Eskerrak nire master amaireako lanaren zuzendariei, Robert Aguirresarobe eta Itxaso Calafel doktoreei. Baita Fermin Elizalde eta Elena Gabirondo doktoreei beraien laguntzagatik.

Botikaz betetako hidrogelen 3D inprimaketa: erreologia-inprimatze baldintzen harremana

Itziar Insua[1], Oliver Etzold[2], Marcelo Calderón[2,3], Robert Aguirresarobe[1]

[1]*POLYMAT eta Polimero eta Material Aurreratuak: Fisika, Kimika eta Teknologia Saila, Kimika Fakultatea UPV/EHU, Manuel Lardizabal hiribidea 3, 20018. Donostia / San Sebastian.*

[2]*POLYMAT eta Kimika Aplikatua Saila, Kimika Fakultatea UPV/EHU, Manuel Lardizabal incidenciahiribidea 3, 20018. Donostia / San Sebastian.*

[3]*IKERBASQUE, Basque Foundation for Science, 48013. Bilbo.*

[a]*itziar.insua@ehu.eus,* [b]*oliver.etzold@polymat.eu,* [c]*marcelo.calderon@polymat.eu,*

[d]*roberto.hernandez@ehu.eus*

Laburpena

3D inprimaketaren bidez hidrogelak prozesatzeko gaitasuna oso interesgarria da osasunaren hainbat arlotan. Horregatik, hidrogelak erabiltzea proposatu da, medikamentu inprimatuak sortzeko. Hala ere, ehun-ingeniaritzako aplikazioetan ez bezala, farmazia-inprimaketak kontrol zehatzagoa eskatzen du prozesu osoan. Lan honetan, materialaren eta prozesuaren alderdi erreologikoak erabiltzen ditugu inprimatutako farmakoak lortzeko behar diren inprimaketa-baldintzak ezartzeko. Horretarako, botikekin nahastutako hidrogelak erabiltzen ditugu, eta horien propietateak aztertzen ditugu, jariakortasunari eta biskoelastikotasunari dagokienez. Bukatzeko, erabilitako inprimaketa parametroak simulazio baten bitartez iragartzen saiatu egin da.

Hitz gakoak: 3D inprimaketa, erreologia, hidrogelak, botikak

Abstract.

The ability to process hydrogels through 3D printing is very interesting in numerus health-related areas. It has therefore been proposed to use hydrogels to produce printed medicines. However, unlike textile engineering applications, pharmaceutical printing requires more thorough control throughout the process. In this work, we use the reological aspects of the material and process to establish the printing conditions necessary for the obtaining of printed drugs. For this we use hydrogels mixed with medicines, and examine their properties in terms of fluidity and viscoelasticity. Finally, attempts have been made to predict the printing parameters used through a simulation.

Keywords: 3D printing, reology, hydrogels, medicines

1. Sarrera eta motibazioa

Azken urteotan, hidrogelen garapenak interes handia piztu du bioteknologiaren eta osasunaren arloetan. Izan ere, hidrogelek aplikazio terapeutiko askoren beharrak betetzen dituzte, propietate biologikoak eta biodegradagarriak dituztelako. Gainera, bere propietate mekanikoak organismo bizidunen uhinen antzekoak izan daitezke egitura kimiko eta fisikoa aldatzean. Espero da hidrogelen propietate mekanikoak molda daitezkeela, eta funtzio garrantzitsua izango dutela mekanobiologia-paradigmak inplementatzeko ehun-ingeniaritzan.[1] Uhinen teknologiaz gain, hidrogelen propietate horiek osasunaren beste arlo batzuetara ere hedatu dira. Adibidez, farmako berrien garapenean hidrogelak erabiltzen hasi dira osasun pertsonalizatuaren paradigma berriari aurre egiteko. Kontzeptu berri horren arabera, pertsona bakoitzak behar dituen farmakoak konbinatu beharko lirateke. Helburu hori lortzeko, material egokiak eta fabrikazio-teknikak modu sinergikoan konbinatu behar dira, tokian eta unean sendagaiak ekoitzi ahal izateko. Azkenaldian hidrogelak erabiltzea proposatu da, 3 dimentsiotan inprimatutako botikak sortzeko.[2]

3D inprimatzeko teknikak hainbat osagai aktibo nahastea ahalbidetzen du, haien izaera kimikoa eta farmakologikoa edozein dela ere; izan ere, osagai bakoitza farmakoaren barruan kokapen desberdinetan

kokatzeko gaitasuna duen teknika baita. Hala ere, kontrol zehatza beharrezkoa da, substantzia aktiboaren azken kontzentrazioa espazio-bereizmenaren mende baitago.

Lan honetan, materialaren eta prozesuaren alderdi erreologikoak (erreologia materialen fluxua eta deformazioa ikertzen duen zientzia izanda) erabiltzen ditugu inprimatutako pilulak lortzeko behar diren inprimaketa-baldintzak ezartzeko. Inprimatzeko baldintzak inprimaketa-motaren araberakoak dira. Gure kasuan, airez lagundutako estrusio-inprimaketa erabili dugu. Teknologia honen bidez, materiala inprimaketa-hodi batetik ateratzen da eta, ondoren, nahi den forma geruzaz geruza lortzen da, materiala modu egokian egonkortuz. Bi baldintza horiek, fluxua eta egonkortzea, materiaren propietate biskokelastikoekin lotuta daude.[3,4] Lan honetan botikekin nahastutako hidrogelak erabili ditugu eta horien fluxuan eta biskoselastikotasunean dituzten propietateak aztertu ditugu.

Azkenik, elementu finituen simulazio bat egin da zeinak akatsik gabeko laginetarako inprimaketa-parametro optimoak aurreikusten dituen. Horretarako, lehenik, parametroen optimizazioa egin zen, eta emaitzak simulazioaren emaitzekin alderatu dira.

2. Atal esperimentala

Botikaz betetako hidrogelak lortzeko karboximetil zelulosa (CMC) eta glizerola urarekin nahastuz lortu ziren, 1. taulan ikusten diren proportzioetan. Hidrogelak botika modelo batekin bete ziren, Atenolol-arekin, hain zuzen. Atenolola antagonista beta-adrenergikoa da. 5 Beta blokeatzaile botika hau tentsio arterial gehiegizkoa eta bularreko ondoeza tratatzeko erabiltzen da. Beta blokeatzaileek, atenololak adibidez, adrenalinak bihotzeko eta odol-hodietako beta hartzaileei eragitea eragozten dute.

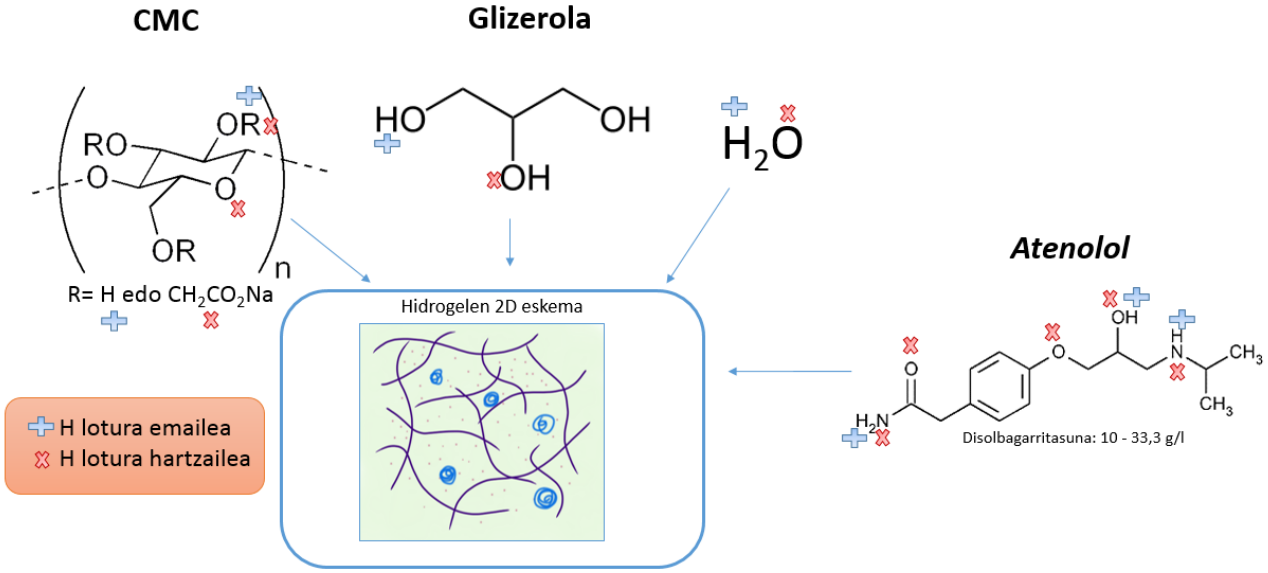
Hidrogel hauen nomeklatura nahiko erraza da, lehenik osagai nagusia adierazten da, GLY kasu honetan glizerolari erreferentzia eginez. Hurrengoa osagai aktiboa da, non A bokala Atenololari dagokio. Azkenik, agertzen den zenbakiak Atenolol kopuruari egiten dio erreferentzia.

1. taula. Lortutako hidrogel ezberdinen konposizioa.

Lagina	Nomenklatura (GLY-A-X)	Osagaien kontzentrazioa (% pisuan)			
		CMC	Glizerola	Ura	Atenolol
1	GLYA0	12,5	82,5	5	-
2	GLYA2	12,5	80,5	5	2
3	GLYA8	12,5	74.5	5	8

Materialen ezberdintasun nagusia Atenolol kopuruan dago. 2. laginean botikaren kontzentrazioa disolbagarritasun mugatik behera dago, hau da, botika hidrogelan disolbatuta dago. 3. laginean aldiz, materiala muga horretatik gora dago eta hortaz, botika hidrogelan sakabanatuta dago.

Hidrogelaren egituran, osagaiek gel fisikoak sortzen dituzte, hau da, molekulen artean ez dira lotura kobalenterik sortzen, hidrogeno loturak baizik. Hidrogeno lotura hauek modu azkar eta itzulkor batean sortu eta desegin daitezke, hidrogelaren erantzun erreologikoa aldatuz. Materialaren egitura hidrogeno lotura emaile eta hidrogeno lotura hartzaileak tartekatuz sortzen da, 1. irudian ikusten den modura.



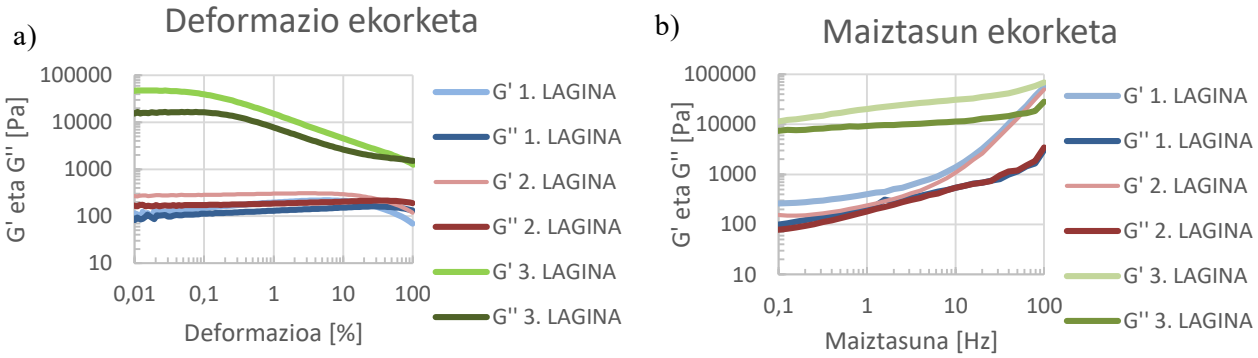
1. irudia. Gel fisikoen sorreraren adierazpen eskematikoa.

Lortutako materialen azterketa erreologikoak Anton Paar MC 101 Tortsio-erreometro batean lortu ziren xafla paraleloak erabiliz, bai fluxu jarraian bai fluxu oszilatzailean eginez. Botikaz betetako hidrogelen 3D inprimaketa 3D-Bioplotter (Developer Series, EnvisionTEC) inprimagailua erabiliz egin ziren eta irteeraren diametroa 0.4 milimetrokoa izan zen.

3. Emaitzak eta eztabaida

3.1. Hidrogelen azterketa erreologikoa

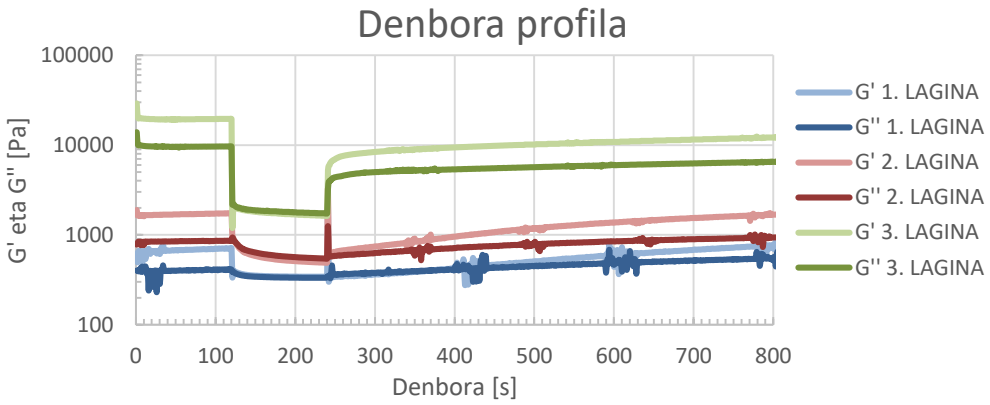
Botikaz betetako hidrogelen inprimagarritasuna ulertzeko, materialen azterketa erreologikoa egin zen modu ezberdinetan. 3D inprimaketan, materiala kapilare batetik isuri egin behar da eta horretarako hidrogelaren egitura desegin behar da materialaren fluxua ahalbidetzeko.6 Portaera hau materialari deformazio ekorketak eginez aztertu zen (2. irudia, a). Behin materialaren fluxua aztertuta, materialak inprimatutako forma mantentzeko duen ahalmena aztertu zen. Prozesu honek bi aldagai nagusi ditu: hidrogelaren berezko propietate biskoelastikoak eta hidrogela sortzeko behar den denbora. Horretarako bi azterketa erreologiko ezberdin egin ziren. Materialaren biskoelastikotasuna aztertzeko maiztasun ekorketak egin ziren 25 ºC-tan (2. irudia, b) eta hidrogelen sarearen zinetika aztertu zen (3. irudia).



2. irudia. a) Ezkerrean deformazio ekorketa ikertutako hiru laginentzako. Lehenengoa botika gabekoa, bigarrena Atenolol kontzentrazio baxukoa eta hirugarrena kontzentrazio handikoa izanda. b) Eskubian maiztasun ekorketa ikus daiteke. Ekorketa bakoitzarentzat 3 aldiz neurtu da lagin berea, baita formulazio bereko beste 2 lagin. Guztira 9 erreplika egin dira datu erreproduzigarriak lortzeko.

Ezkerreko grafikoan ikusi daitekeen bezala, materialek portaera lineala erakusten dute deformazio balio txikietan, non elastikotasun modulua (G') likatasun modulua (G'') baino altuagoa den. Hortaz, materialek solido biskoelastikoen portaera erakusten dute. Gainera, botika gehitzean, materialaren modulua nabarmenki igotzen da. Deformazio altuetan (%100), ordea, G''-a G' baino haundiagoa izaten da; hau da, likido moduko izatera erakusten du materialak. Portaera aldaketa honek, materialaren inprimatzea ahalbidetzen du, deformazio hauek baitira inprimatze hodiaren barruan ematen direnak. Portaera hau botikaz betetako zein bete gabeko hidrogeletan ematen da.

Eskubiko grafikoan hidrogelek portaera nagusiki solidoa (G'>G'') erakusten dute maiztasun guztietan. Emaitza hauek bat datoz gel fisiko baten portaerarekin. Atenolol kopuruaren eragina aztertuz, disolbagarritasun limitetik behera, elastikotasun txikiko solido bezala portatzen da, eta material txuritik (bete gabeko materialetik) ez da asko aldentzen. 3. lagina aldiz, portaera solido nabarmena aurkezten du, izan ere, Atenolol partikula solidoek bigarren egitura bat sortzen dute, horrela hidrogelaren egitura trinkotuz. Ezberdintasun hauek inprimatutako pilulen portaerarekin lotu daitezke, 3.2 atalean ikusiko den moduan.

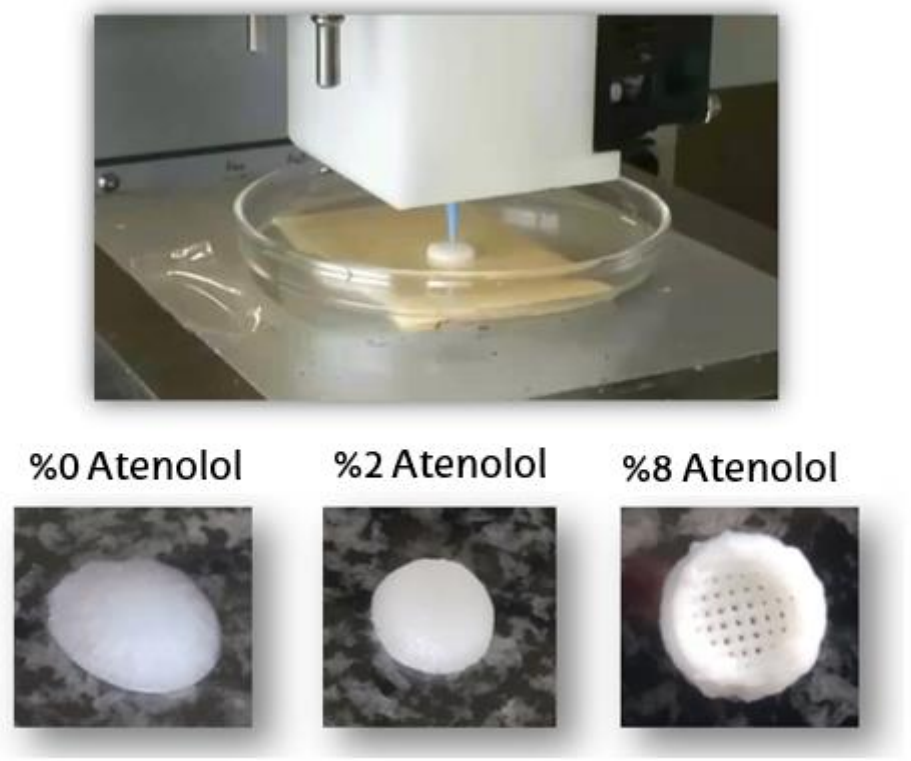


3. irudia. Laginen denbora profila. Materialaren egituraren berreskuraketa ikusi daiteke denboraren arabera.

3. irudiko esperimentu hauek hiru zati dituzte. Lehenengoan anplitude txikiko deformazioak (deformazio lineal eremuan) aplikatzen zaizkio hidrogelari eta horrela bere egitura ez da deformazioagatik eraldatzen. Hortaz, hasierako portaera solidoa (G'>G'') ikusten da lagin guztietan. Bigarren zatian aldiz, zona linealetik kanpoko deformazioak aplikatzen dira, hidrogelaren egitura deseginez (G''>G'). Hirugarren zatiak hidrogelaren formakuntzaren zinetikari buruzko informazioa ematen digu. Ikusi daitekeen bezala, 1.go eta 2. laginetan berreskurapen prozesu hau oso mantsoa da. 3. laginean aldiz, berreskurapena bat-batekoa da, hidrogelaren itzulgarritasuna frogatuz. Sarearen birformazioa oso azkarra da. Hara ere, kasu guztietan moduluek ez dute bere hasierako balioak berreskuratzen, sortutako 3d sarea puskatzerakoan materialan aldaketa bat ematen dela frogatuz.

3.2. Botikaz betetako hidrogelen inprimaketa

Behin hidrogelen ezaugarri erreologikoak aztertuta, hidrogel hauen inprimagarritasuna frogatu zen. Horretarako hidrogelak giro tenperaturan airez lagundutako estrusio inprimagailu baten bidez inprimatu ziren eta lortutako egiturak 4. irudian ikusi daitezke.



4. irudia. Lortutako hidrogelen inpresioak.

Nahiz eta programatutako egitura berdina izan, zilindro bat, lortutako inprimakiak forma ezberdina erakusten dute. Botika gabeko laginak ez du forma mantentzen eta tanta forma hartzen du. Atenolol kopuru txikiko lagina, forma mantentzeko gai da baina lortutako bereizmen maila txikiagoa da 3. laginarekin konparatzen badugu. 3. lagina erabiliz bereizmen maila handitu zen, eta mikroporoak lortzea lortu genuen. Gure ustez, 2. irudian ikusitako propietate erreologikoen arabera, beraien G' balioak oso baxuak dira eta horregatik ezin da bereizmen maila egokia lortu . %8 Atenolol duen laginak ordea, forma mantentzeko gai da eta bereizmen maila egokia, izan ere, bere moduluek eta hauek berreskuratzeko ahalmenak materiala kokatutako tokian eustea ahalbidetzen du.

3.3 Hidrogelen inprimaketa - parametroen optimizatzea

3D inprimaketan egindako hurrengo urratsa parametroak optimizatzea izan zen. Parametroen optimizazioaren atzean, material bakoitzerako geruzen arteko abiadura eta presioa optimizatzea izan zen ideia, eta datu horiek simulazioarekin lortutako parametro idealekin alderatzeko erabiltzea.

Helburu horrekin, taulako datuen grafikoak egin ziren (adibidea 2. taulan ikus dezakegu).

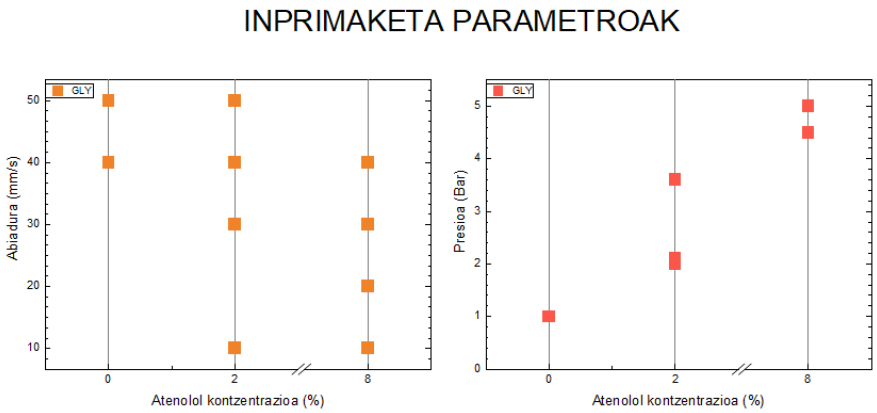
2. taula. Nahasketa bakoitzerako egindako inprimaketa-parametroen optimizazioaren adibidea. GLYA2 2. Laginarentzako erabilitako nomenklatura da. Forma berdeak baldintza horietarako materiala modu ezin hobean inprimatu zela esan nahi du. Horiak, bestalde, materiala inprimagarria zela esan nahi du, baina lortutako pilula ez zen ideala. Azkenik, gorriak materiala ezin zela ongi inprimatu esan nahi zuen, bai presio/abiadura baxuegia ezartzen zelako edota material gehiegi ateratzen zelako.

GLYA2	Pressure (bar)			
Speed	1,2	2	2,1	3,6
10 mm/s	X	✓	X	X
20 mm/s	X	✓	✓	X
30 mm/s	X	✓	✓	X
40 mm/s	X	✓	✓	X
50 mm/s	X	X	X	✓

Datuen interpretazioa nahiko erraza da, koloretako legenda aplikatuta. Honako taula guztietan eredu argi bat ikus dezakegu: inprimatzeko baldintza onak diagonalean agertzen dira beti. Jokabide horretatik atera dezakegun ondorio zuzen eta logikoa da inprimatze-egoera ona lortzeko, presioa eta abiadura proportzionalki egokitu behar direla.

Gainera, patroi bat ikus daiteke botiken kontzentrazioaren eta inprimatzeko baldintza optimoen artean. Biotintak elastikoagoak dira botiken kontzentrazioa handitzen den heinean, eta presio eta abiadura handiagoak behar dira horiek bereizmen-maila altuarekin inprimatzeko.

Inprimatzeko parametro optimoen datuak 5. irudian laburbildu dira.



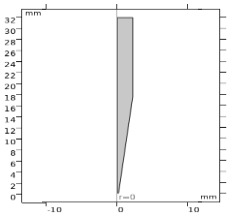
5. irudia. Formulazio bakoitzeko inprimaketa baldintza optimoak.

Irudi honetan ikus ditzakegu materiala inprimatzeko parametro optimoak batuta (ikono berdeak tauletan). Presio-grafikoan (eskubian) argi ikusten da joera non, botiken kontzentrazioa handitu ahala, materialak presio handiagoko balioak behar dituen. Abiaduraren grafikoan (ezkerrean), ordea, badirudi joera ez dela hain argia. Materiala inprimatzeko hainbat abiadura-balio daude. Hala ere, logikoa dirudi, lehen azaldu dugun bezala, presioa handitzen den heinean abiadura ere handitu behar izatea, inprimagailuaren muturretik material gehiegi ez ateratzeko. Grafiko honek inprimaketa-grafikoak ematen duen informazio bera erakusten du.

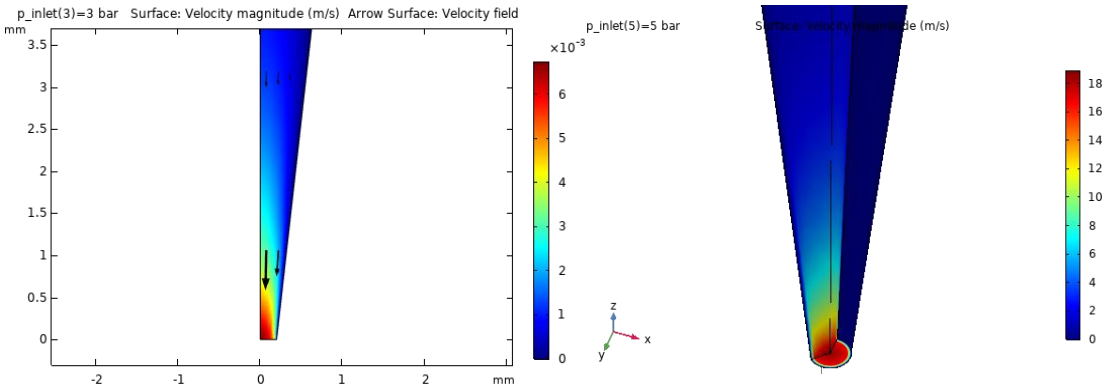
3.4 Inprimaketa parametroen simulazioa

Elementu finituen simulaziorako eraikitako eredua errazena da.[7] Geometria eraikitzeko puntaren dimentsioak baino ez ditu behar, 6. irudian agertzen den moduan. Geometria eraiki ondoren, materialak haien likatasun kurbaren arabera zehazten dira , horrela, emaitzak materialaren arabera aurkezteko.

Modeloarekin hainbat parametro simulatu ziren. Hasteko, 7. irudian adierazten den moduan, materialak punta ateratzeko duen abiadura kalkulatzen da. Simulazio programak 2D eta 3D grafikoak egiten ditu.



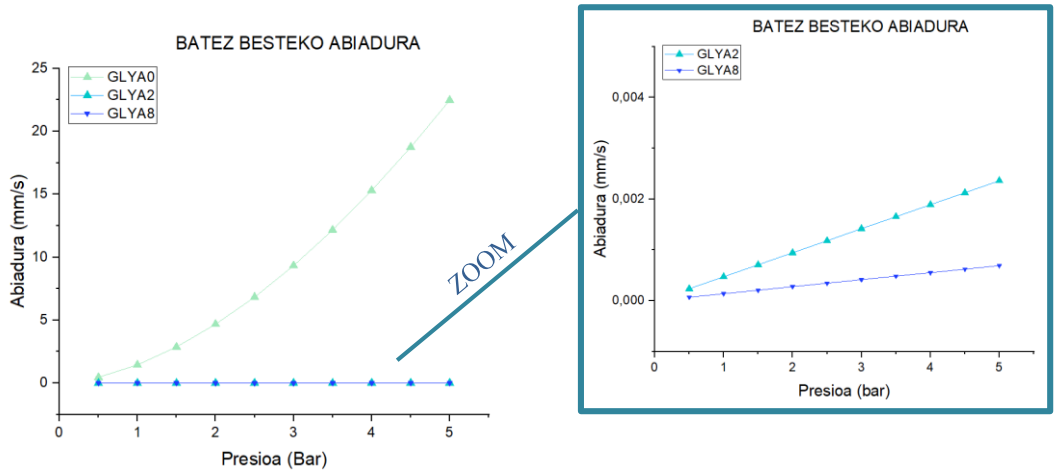
6. irudia. Inprimatzeko erabilitako pitaren geometria.



7. irudia. 2D (ezkerrean) eta 3D (eskuinean) grafikoak, 3. Laginarako baldintza jakin batzuetan simulatuz lortutako abiadurak. Pitako paretarekin marruskaduragatik sortutako abiaduraren gradientea. Abiadura handiena pitako erradiorik txikienaren erdian lortzen da.

7. irudiak muturreko abiadurari buruzko informazioa ematen du. Zentzuzkoa da pentsatzea abiadura handiena puntaren erdian lortzen dela, hormaren marruskadura ez baita hain eraginkorra. Gainera, abiadura handitu egiten da materiala puntara iristen den heinean, erradioa gutxitzen denean materialak abiadura handiagoak lortzen ditu-eta.

2D eta 3D grafikoez gain, 1D grafikoa ere lor daiteke pitaren puntaren batez besteko abiadurarekin 8. irudian ikus daitekeen moduan.



8. irudia. Lagin bakoitzarentzako pitaren puntan lortutako batez besteko abiadurak.

Pitaren puntaren batez besteko abiadura materialaren eta presioaren araberakoa da, espero zen bezala. Hala ere, abiadura-aldaketa nahasketen likatasuna kontuan hartuta ez da hain ideala. Likatasun baxueneko nahasketak botika gabekoak dira eta, logikaz, nahasketa hauek abiadura handienetara iritsi beharko lukete.

Beste aldetik, joera argia ikusten da: presioa handitu ahala, abiadura ere handitu behar da. Hala ere, hiru laginetarako lortutako balioak baxuegiak dira. Nahiz eta balio txikiak erakutsi, joera esperotakoa da.

Azkenik, esan dezakegu simulazioarekin lortutako abiadura-balioak inprimatzeko erabiltzen diren abiaduren maila berean daudela (1-50 mm/s), eta hori aurrerapen handia da. Hala ere, argi ikus dezakegu simulazioak oraindik hobeto egokitu behar duela biotinta konplexuen portaerara, balioak ez baitatoz bat abiadura optimoekin. Hortaz, gai honi buruzko etorkizuneko ikerketetan hobetzeko aukera dago.

4. Ondorioak

Lan honetan botika kargak hidrogelen propietatetan eta beraien inprimagarritasunean duten eragina aztertu da. Emaitza erreologikoen arabera, nahiz eta botika sakabanatuta egon, hau da, bere disolbagarritasun mugatik gora egon, honek ez ditu bere fluxu ezaugarriak murrizten. Aldiz, bere propietate biskoelastikoak hobetzen dira, bai azkeneko elastikotasun modulua eta honen berreskurapena ere. Izan ere, G'-ren balioa altua eta honen berreskurapena bat-batekoa izateak inprimatutako laginaren bereizmen maila hobetu du.

Simulazio-ereduarekin erlazionatuta, ikus daiteke ez dela egokitzen ikertutako inprimaketa-parametro optimoetara, seguruenik materialaren konplexutasunagatik. Lortutako emaitzak hain zehatzak ez diren arren, esan beharra dago ikerketa honekin prozesuen modelizazioaren sistematizazioa lehen baino gertuago gaudela, materialetarako lortutako joerak espero zirenak baitira.

5. Etorkizuna

Lan honetan prestatutako nahasketen karakterizazio sakon bat egin da, baita 3D inprimaketa prozesua iragartzeko saiakera bat ere. Hala ere, argi dago oraindik lan asko dagoela egiteko. Etorkizunean urrats hauek jarraitu daitezke:

Karakterizazio fisiko eta morfologia azterketa gehiago egin daitezke hidrogelen egitura hobeto ulertzeko.

3Dko inprimaketari dagokionez, nahiz eta pilulen inprimaketa ona lortu den, oraindik ere bereizmen hobea bilatzen da, eta hori lor liteke parametroen optimizazioa inprenta-prozedurari aplikatuz.

Azkenik, simulazioak ez du espero bezala funtzionatu, nahiz eta lortutako parametroak errealitatetik ez dauden hain urrun. Horrela, gaia sakonago ikertu behar da simulazioa egokitzeko eta konpontzeko arrazoia aurkitzeko.

6. Eskerrak

Ikerketa hau Esko Jaurlaritzako ELKARTEK (KK-2019/00048) programaren, Doktoratu Aurreko programaren, hazkunde-faktoreetan aberatsak diren biomaterialetan oinarritutako oftalmologia ehunen birsorkuntza KERAMNIOGEL (Exp. zenbakia 2022333039) programaren eta osasun arloak emandako osasunari buruzko ikerkuntza- eta garapen-proiektuetarako laguntzen 2022ko deialdiaren bitartez burutu da.

7. Erreferentziak

(1) A. Forget, R. A. Pique, V. Ahmadi, S. Lüdeke, and V. P. Shastri, "Mechanically tailored agarose hydrogels through molecular alloying with β-sheet polysaccharides.," *Macromol. Rapid Commun*., vol. 36, no. 2, pp. 196–203, Jan. 2015, doi: 10.1002/MARC.201400353.

(2) O. Ivanova, C. Williams, and T. Campbell. (2013) "Additive manufacturing (AM) and nanotechnology: Promises and challenges*," Rapid Prototyp.* J., vol. 19, no. 5, pp. 353–364. doi: 10.1108/RPJ-12-2011-0127.

(3) Zuidema J. M., Rivet C. J., Gilbert R. J., eta Morrison F. A. (2014), A protocol for rheological characterization of hydrogels for tissue engineering strategies, *J. Biomed. Mater. Res*. - Part B Appl. Biomater., Vol. 102, no. 5, 1063–1073, 1063.

(4) Kanai H., Navarrete R. C., Macosko C. W., eta Scriven L. E. (1992), Fragile networks and rheology of concentrated suspensions, *Rheol. Acta*, Vol. 31, no. 4, 333–344, 333.

(5) N. Rouge et al. (1998). "Comparative pharmacokinetic study of a floating multiple-unit capsule, a high-density multiple-unit capsule and an immediate-release tablet containing 25 mg atenolol," *Pharm. Acta Helv*., vol. 73, no. 2, pp. 81–87. doi: 10.1016/S0031-6865(97)00050-2.

(6) TA Instruments, Understanding Rheology of Structured Fluids, (2021), *TA instruments*, 1-11.

(7) C. M. Ionescu, I. R. Birs, D. Copot, C. I. Muresan, and R. Caponetto (2020) "Mathematical modelling with experimental validation of viscoelastic properties in non-Newtonian fluids," *Philos. Trans. R. Soc. A*, vol. 378, no. 2172. doi: 10.1098/RSTA.2019.0284.

Gehigarri polimerikoen sintesia eta zementuaren hidratazioan daukaten eraginaren azterketa

Aitor Barquero[1], Sara Beldarrain[1], Alejandro Herranz[1], Edurne Erkizia[2], Jorge Sanchez-Dolado[3], Jose Ramon Leiza[1]

1.POLYMAT, Kimika Aplikatua Saila, Kimika Fakultatea, Euskal Herriko Unibertsitatea UPV/EHU, Joxe Mari Korta Zentroa, Tolosa Hiribidea 72, 20018 Donostia

2.TECNALIA, Basque Research and Technology Alliance (BRTA), Astondo kalea, 700 eraikina, Parque Tecnológico de Bizkaia, 48160 Derio

3.Centro de Física de Materiales, (CSIC, UPV/EHU) Materials Physics Center (MPC) Paseo Manuel de Lardizabal 5, 20018 Donostia

aitor.barquero@ehu.eus

Laburpena

Zementuan oinarritutako materialen propietateak hobetzeko, PCE (polycarboxylate ether) deituriko gehigarri polimerikoak erabiltzen dira. PCEek zementu-pastaren maneiukortasuna hobetzeaz gain, zementuaren hidratazioa atzeratzen dute. Lan honetan egitura desberdinak dauzkaten PCEak sintetizatu ditugu erradikal askeen bidezko polimerizazio bidez, ondoren Portland zementu (OPC) batek eta zementu horren fase kristalino nagusiek daukaten eragina aztertu da. Ikusi da, OPCaren hidratazioaren atzerapena karboxilato-dosiarekiko proportzionala dela, eta PCE guztiak kurba nagusi batera doitu daitezkeela. Fase kristalinoak banaka aztertzean, aldiz, ez da hori betetzen, eta albo-katearen luzera bakoitzak bere kurba propioa daukala ikusi da.

Gako-hitzak: Superplastifikatzaileak, Portland zementua, hidratazio-zinetika.

Abstract

Polymeric additives such as polycarboxylate ethers (PCE) are widely used to improve the properties of cement-based materials. PCEs not only improve the workability of the cement paste, but also delay the hydration of the cement. In this work, we synthesized PCEs with different structures, by means of free-radical polymerization, and then analyzed the effect they have on an Ordinary Portland Cement (OPC) cement and the main crystalline phases of that cement. It has been observed that on OPC the hydration delay is proportional to the carboxylate dose, and that all PCEs can be adjusted to a master curve. When analyzing the crystalline phases individually, however, this is not fulfilled, as each side chain length has its own curve.

Keywords: Superplasticizers, Ordinary Portland Cement, hydration kinetics

1. Sarrera eta motibazioa

Portland zementua mundu osoan gehien erabiltzen den eraikuntza-materiala da, eta hortaz, industria horrek eragin nabarmena dauka ingurumenean. Hori arazo larria bada ere, ezin da imajinatu gaur egungo gizartea material hau gabe. Horregatik, ezinbestekoa da zementuaren inguruan ikerkuntza gehiago garatzea, haren propietateak hobetzeko asmoz. Modu horretan, zementuz egindako egituren iraunkortasuna luzatu daiteke, baita eraikuntza horiek egiteko beharrezko zementu kopurua murriztu ere.

Zementuan oinarritutako materialen propietateak hobetzeko moduetako bat gehigarriak gehitzea da. Guk lan honetan landuko ditugunak PCE (polycarboxylate ether) moduko superplastifikatzaileak dira. Zementua eta ura nahasten direnean (zementu-pasta sortzeko), likatasun handiko nahaste bat sortzen da, askotan manipulatzen zaila dena. Likatasuna jaisteko ur gehiago gehitu daitekeen arren, horrek ondoren materialaren propietateak kaltetzen ditu ondoren, eta hortaz, ez da konponbiderik onena. Aldiz, superplastifikatzaileak kopuru txikitan gehitzeak ez du amaierako propietateetan eragin handirik, baina likatasuna asko jaits dezake. Horri esker, zementu-pastak ur gutxiagorekin presta daitezke maneiukortasuna mantenduz, baina kalitate handiagoko zementuak lortzen direnez, zementu gutxiago erabiltzea ahalbidetzen digu.

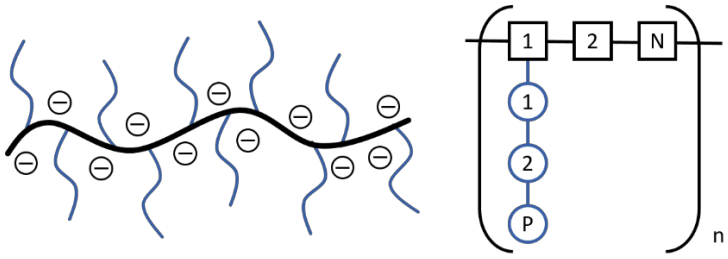
Gehigarri hauek orrazi-itxura daukaten polimero-kateak dira (ikusi 1. irudia, ezkerrean), non kate nagusia negatiboki kargatuta dagoen, eta albo-kateak hidrofilikoak diren. Zementu-partikulak positiboki kargatuta daude, eta hortaz, indar elektroestatikoei esker, PCEak erraz adsorbatzen dira partikulen gainazalean. PCE mota desberdinak daude, baina merkatuan ohikoenak, eta hemen landuko direnak, MPEG motakoak dira, zeinak industrian azido metakrilikoaren (MAA) eta polietilen metakrilatoaren (PEGMA) arteko erradikal askeen bidezko kopolimerizazio bidez lortzen diren (Emaldi et al., 2020). Hortaz, MPEG motako superplastifikatzaileak oso familia zabala dira; MAA/PEGMA erlazioa aldatuz, edo PEGMAren albo-katearen luzera aldatuz oso egitura desberdinak dauzkaten kateak lor daitezke. Duela 40 urte baino gehiago asmatu ziren arren, oraindik ez da oso argia polimeroaren egituraren eta zementuan daukaten eraginaren arteko erlazioa. Funtsezkoa da, beraz, egitura-propietate erlazioa ondo ulertzea, ondoren emaitza onenak emango dituzten PCEak diseinatu eta erabili ahal izateko

2. Arloko egoera eta ikerketaren helburuak

PCEak erabiltzearen helburua zementu-pastaren likatasuna jaistea bada ere, badauka beste eragin nabarmen bat (eta ez beti desiragarria), zementuaren hidratazioa atzeratzea, zehazki. Hidratazioa prozesu kimiko izugarri konplexua da, zementuaren fase desberdinak urarekin erreakzionatzen hasten direnean gertatzen dena. Hori dela eta, maiz, erreakzio bakoitza banan banan aztertu ordez, prozesua osotasunean ikertzen da. Hortarako, eta hidratazioa exotermikoa dela aprobetxatuz, hidratazio-kalorimetria erabiltzen da zementuaren eta PCE-en arteko interakzioa aztertzeko.

Zenbait lan modu sistematikoan hasi dira aztertzen PCE-ek zementuaren hidratazioan daukaten eragina. Flatten taldeak orrazi-itxurako polimeroaren unitate errepikakorra hiru parametrotan laburbildu zuen: kopolimeroaren bizkarrezurra irudikatzen duen segmentu kopurua (n), segmentu bakoitzeko monomero kopurua edo karga-dentsitatea (N) eta albo kateak dituen etilen oxido (EO) unitate kopurua (P) (Flatt et al., 2009). 1. irudian (eskuinean) parametro horien irudikapena ikus daiteke.

1. irudia. Orrazi itxurako-PCE kopolimeroen eskema (ezkerrean) eta N, n eta P parametroen irudikapena (eskuinean)



Parametro hauek PCEak ur-disoluzioan izango duen konformazioa aurresateko erabil daitezke, eta horren arabera, baita zementuan nola adsorbatuko diren ere. Horren ondoren, talde berak aldagai hauek zementuaren hidratazioaren zinetikan zeukaten eraginarekin lotu zituen (Marchon et al., 2017). Laburtuz, ondorioztatu zuten benetan hidratazioaren atzerapena karboxilato-dosiarekiko proportzionala zela. Lan guztia esterifikazio bidez lortutako PCEak, eta ereduzementu bat erabiliz egin zuten. Geroago, Emaldik erakutsi zuen erlazio horiek (2022) erradikal askeen bidez egindako PCEak erabiliz zementu komertzial batean ere betetzen zirela. Industrian erabiltzen den teknika hau aurreko ikerketena (Marchon) baina errealagoa da. Guk lan honetan Emaldik egindako lana zabaldu dugu, alde batetik erabilitako PCE mota kopurua handituz, eta bestetik fase kristalino bakoitza bere baitan aztertuz.

3. Ikerketaren muina

3.1Atal esperimentala

Materialak

Luzera desberdineko polietilen glikol metil eter metakrilatoak (PEGMA) erabili ziren, 22,5, 45 eta 113 etilen glikol unitate zituztenak, Evonik Industries enpresak eskuzabaltasunez hornitu zizkigunak. Azido metakrilikoa (MAA) Across Organics enpresan erosi zen. PCEen sintesirako eta karakterizaziorako erabilitako gainerako erreaktiboak (azido 3-merkaptopropionikoa (3-MPA), potasio persulfatoa (KPS), sodio bikarbonatoa ($NaHCO_3$), sodio nitratoa ($NaNO_3$) eta sodio hidroxidoa (NaOH)), Sigma-Aldrichen erosi ziren. Ur deionizatua disolbatzaile moduan erabili zen. Erabilitako zementua CEM I motako 52,2R Portaland zementua (OPC) izan zen, Cementos Lemona S.A. enpresak eman ziguna. Fase kristalinoak, Alita (C_3S) belita (C_2S) eta kaltzio aluminatoa (C_3A) Bonding Chemicalen erosi ziren.

PCEen sintesi eta karakterizazioa

PCEak soluzio-polimerizazio bitartez sintetizatu ziren, KPS hasarazlearekin eta ura disolbatzaile moduan erabiliz, 70 ºC-an. Polimerizazio erdijarraitua erabili zen, non, monomeroak erreakzioan zehar elikatu ziren, kopolimeroen konposizioa kontrolatzeko.

Hamabi kopolimero sintetizatu ziren, PEGMA albo-katearen luzera (etilen oxido kopurua) eta MAA/PEGMA erlazio desberdinak konbinatuz, 1. taulan adierazita dagoen moduan. Serie bakoitza (M, L eta XL), PEGMAren EO kopuruaren arabera izandatu da.

1. taula. Sintetizatutako kopolimeroen ezaugarriak.

PCEaren izena	EO kopurua PEGMAn	MAA/PEGMA erlazioa (mol)
0,67/1-M	22,5	0,67/1
1/1-M		1/1
3/1-M		3/1
6/1 M		6/1
0,67/1-L	45	0,67/1
1/1-L		1/1
3/1-L		3/1
6/1-L		6/1
0,67/1-XL	113	0,67/1
1/1-XL		1/1
3/1-XL		3/1
6/1-XL		6/1

PCEak sintetizatu ondoren P, N eta n egitura-parametroak determinatu ziren. P parametroa hornitzaileak PEGMA bakoitzerako emandako baliotik hartu zen, MALDI-TOF erabiliz zuzena zela ikusi zelako. N parametroa formulazioan erabilitako monomero erlaziotik kalkulatu zen, ^{13}C-EMN bidez hausazko kopolimeroak lortu zirela neurtu ondoren. n parametroa kopolimeroen pisu molekularra neurtu ondoren kalkulatu zen. Pisu molekularrak neurtzeko Fluxu-Asimetrikoko Fluxu-Eremuko Zatikapena (AF4) erabili zen.

Zementuen hidratazioa

OPC zementuaren zein fase bananduen hidratazio-zinetikak TAM aire-kondukzio bidezko kalorimetroa erabiliz egin ziren, giro-tenperaturan eta 48 orduz, ura erreferentziazko material gisa erabiliz. Pastak 0,4 ur/fase erlazioan prestatu ziren 5 g-ko pisu totala zutelarik. Konposatuen nahastea Vortex nahasgailua erabiliz prestatu zen honako prozedura jarraituz: 800 bira/min 90 segundoz, 60 segundoko geldialdia eta 800 bira/min 90 segundoz.

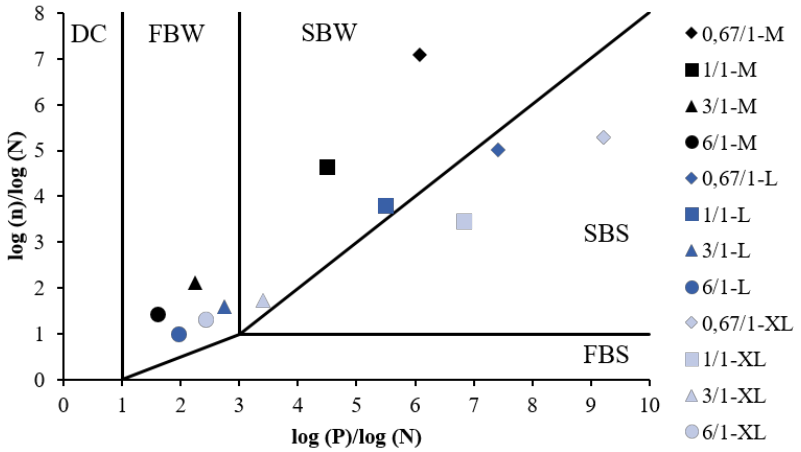
Kopolimero-konposizio eta kate-luzera ezberdineko superplastifikatzaileak kontzentrazio ezberdinetan (0,5 eta 4 mg PCE/g_{fase} artean) aztertu ziren analisi kalorimetrikoa erabiliz. PCEak uretan disolbatu ziren zementuarekin nahastu aurretik, adizio zuzenez ezagutzen den metodoa erabiliz.

3.2 Emaitzak eta eztabaida

PCEen karakterizazioa

Polimerizazio guztietan konbertsio altuak lortu ziren. PCEek uretan zeukaten konformazioa determinatzeko, P, N eta n parametroak neurtu ziren. Ondoren, Gay eta Raphaelek (2001) garatutako fase-diagraman irudikatu ziren, 2. irudian aurkezten den moduan. Fase diagrama honek polimero kateen konformazioa aurresaten du, P, n eta N paremetroen arabera.

2. irudia. Sintetizatutako PCE desberdinen konformazioa, Gay eta Raphaelen (2021) fase-diagraman.

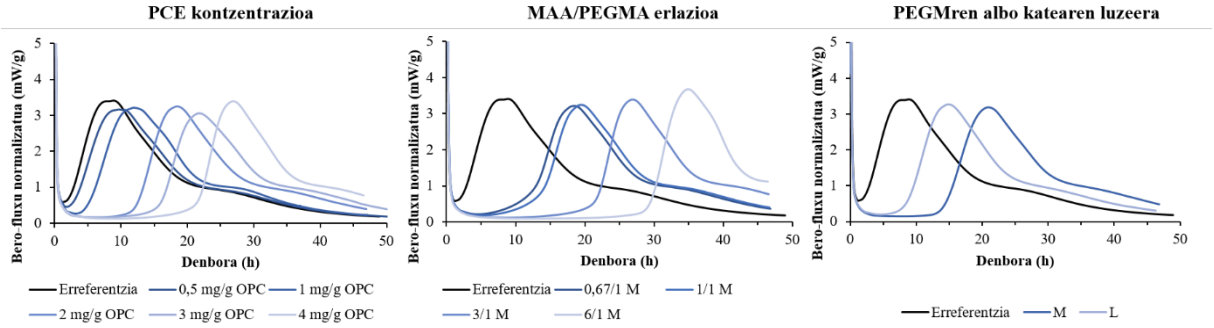


Antzeman daitekeenez, 3 konformazio desberdinetako kateak lortu dira. Non MAA/PEGMA erlazio handiena (3/1 eta 6/1) duten kopolimeroek orokorrean *flexible backbone worm* (FBW) konformazioa hartzen duten, eta albo-kateen dentsitate handiagoa duten kopolimeroek *stretched backbone worm* (SBW) edo *streched backbone star* (SBS) konformazioa hartzen duten. Flatten eredua FBW motako kateentzat garatu zenez, interesgarria da aztertzea ea beste konformazioa daukaten kateen kasuan emaitza konparagarriak lortu daitezkeen.

OPCaren hidratazio-zinetika

OPCaren hidratazioa M eta L serieko kopolimeroekin aztertu zen. 3 aldagairen eragina aztertu zen: PCE dosia (kontzentrazioa), eta dosi bakoitzerako, erabilitako PCEa, MAA/PEGMA erlazioaren eta albo-katearen luzeraren arabera. 3. irudian parametro bakoitzarentzako esanguratsuak diren hidratazio esperimentuen emaitzak emaitzak daude ikusgai.

3. irudia. OPCaren hidratazioan PCE dosiak (ezkerrean), MAA/PEGMA erlazioak (erdian) eta albo-katearen luzerak (eskuinean) daukaten eragina



3. irudian (ezkerrean) PCEen kontzentrazioak OPCaren hidratazio-zinetikan duen eragina erakusten da 3/1-M PCEaren kasurako. Argi ikusten den moduan, PCE dosia igo ahala, hidratazioaren bero-sortzea atzeratu egiten da. Aipagarria da sintetizatu diren PCE guztiek joera bera azaldu dutela.

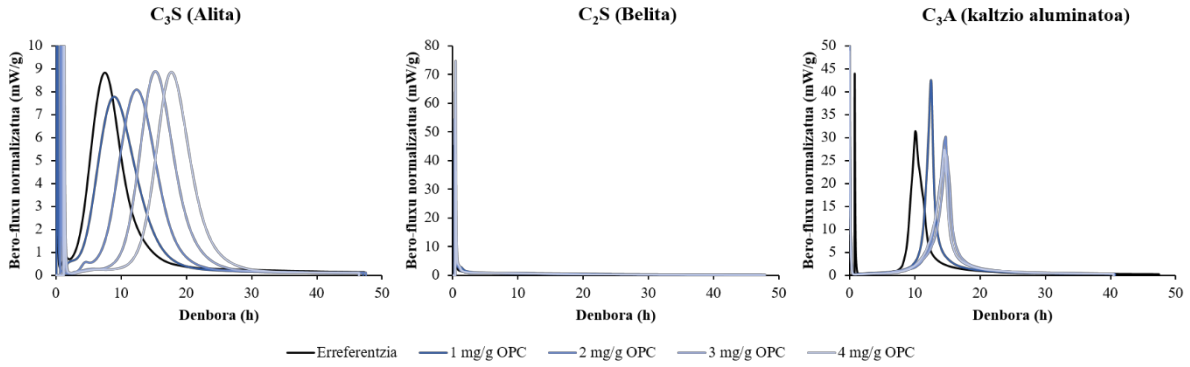
3. irudiaren erdiko grafikoko M seriean, MAA eta PEGMA erlazioa aldatzeak hidratazioan daukan eragina erakusten da. Antzeman daitekeenez, erlazio hori igotzen den heinean (hau da, azido gehiago jartzerakoan), atzerapena nabariagoa da.

Azkenik, 3. irudiaren eskuineko irudian MAA/PEGMA erlazio berdina duten eta dosi berdinean gehitutako baina albo-katearen luzera desberdineko PCEak konparatzen dira. Argi dagoenez, albo kate motzagoa daukan PCEak eragin handiagoa dauka hidratazioaren atzeratzean.

Zementuaren fase kristalinoen hidratazio-zinetika

Zementuaren 3 fase kristalinoen hidratazioa M, L eta XL serieko PCEak erabiliz aztertu zen, baina orokorrean antzeko emaitzak lortu zirenez, adibide moduan 4. irudian XL serieko PCE baten (1/3-XL) dosiaren eragina aurkeztu da.

4. irudia. 1/3-XL PCEaren kontzentrazioaren eragina OPCa osatzen duten fase kristalinoen hidratazioan.



Fase kristalinoak banan-banan aztertzen direnean lortzen diren emaitzak nahiko desberdinak dira, fase kristalinoaren arabera. C_3S fasearen (alita) portaera OPCarenaren oso antzekoa da. Izan ere, OPCaren osagai garrantzitsuena da. Desberdintasun nabargarriena hemen piko bakarra ikustea. Gehitutako superplastifikatzaileak daukan eraginari dagokionez, OPCan ikusten den portaera oso antzekoa dela antzeman daiteke, PCE kopurua igotzean, hidratazioa atzeratzen baita.

C_2S (belita) faseak oso portaera desberdina dauka. Bero-fluxuaren kurban ez da pikorik ikusten, hidratazio-erreakzioa gertatzen ari bada ere, oso motela delako. Hortaz, PCEa gehitzeak ez du desberdintasunik sortzen ikusten ditugun emaitzetan.

Azkenik, C_3A (kaltzio aluminato) fasea aztertu zen. Esan beharra dago, lagin hauetan % 10 pisuan igeltsu (kaltzio sulfato) gehitu zitzaiola, hori gabe erreakzioa kalorimetriaz jarraitzeko azkarregia zelako. Interesgarria da ikustea nola hemen ere superplastifikatzailea gehitzeak atzerapen bat sortzen duen; halabaina, dosi handiek ez dute atzerapen handiagorik sortzen. Litekeena da 2 mg/g_{OPC} dosia nahikoa izatea C_3A partikulen azalera guztia estaltzeko, eta horregatik PCE gehiago gehitzeak eraginik ez izatea.

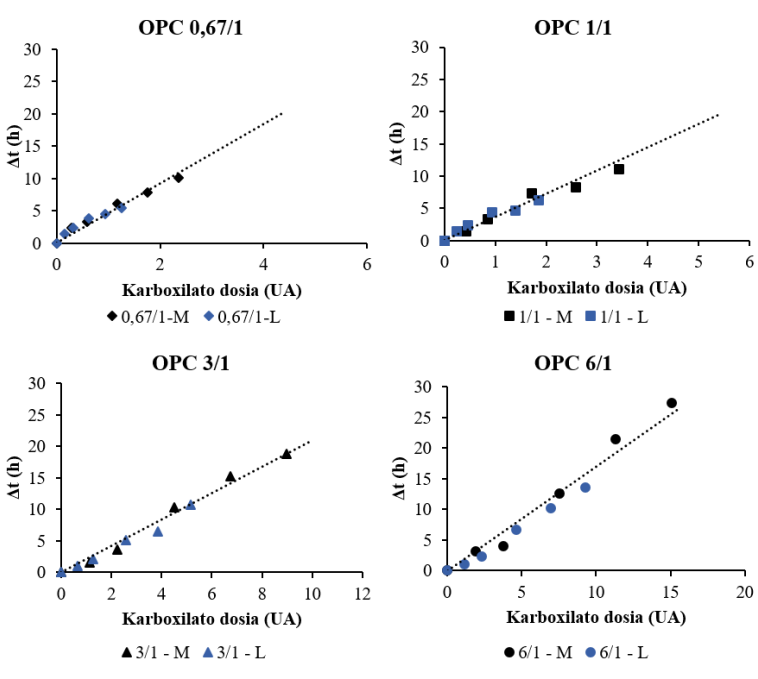
Hidratazioaren atzeratzearen eta PCEaren mikroegituraren arteko korrelazioa

Behin hidratazio-kurbak erakutsita, interesgarria da aztertzea ea hidratazioaren atzerapena eta PCEaren mikroegitura modu arrazionalean lotu daitezkeen. Horretarako, Marchon eta lankideen lanari jarraikiz (Marchon et al., 2017), hidratazio-pikoaren atzeratzea (Δt) karboxilato-dosiaren (1 ekuazioan adierazitako moduan) aurrean irudikatu da.

$$\text{Karboxilato dosia} = c_{PCE}\left(\frac{C/E}{M_{RU}}\right) \quad (1)$$

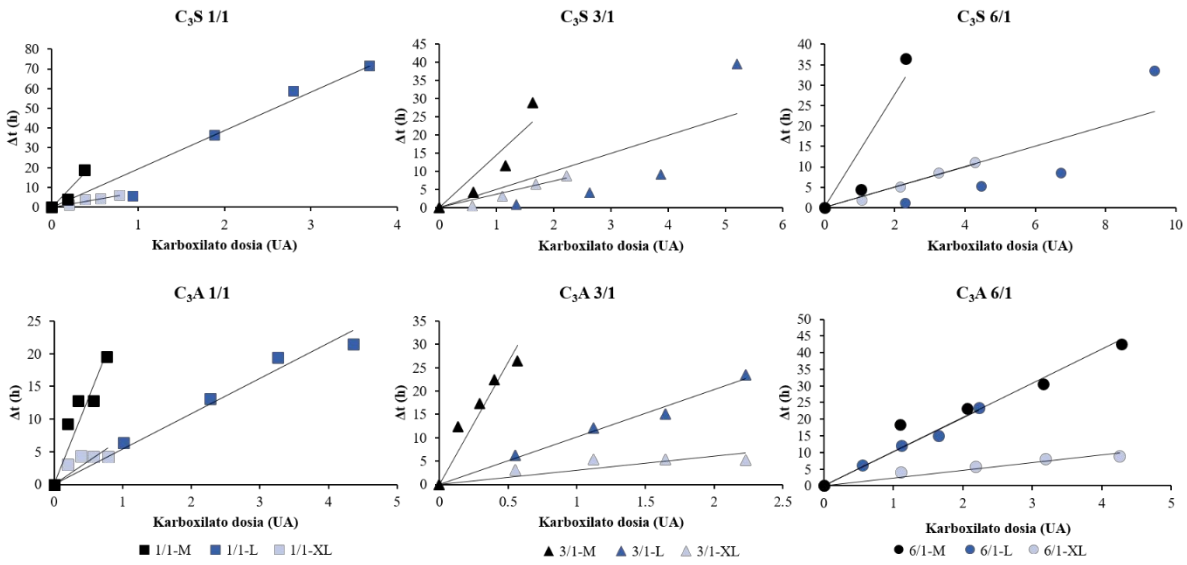
non c_{PCE} PCEaren dosia den (mg/g_{fase}), M_{RU} errepikapen-unitatearen pisu molekularra (g/mol) eta C/E PEGMA/MAA erlazioa diren. 5. irudian OPCaren kasua erakusten da eta 6. Irudian, aldiz, zementuaren hiru fase kristalinoen kasua.

5. irudia. OPC zementuaren hidratazioaren atzerapena konposizio desberdina daukaten PCE dosiaren aurrean.



5. irudian ikusi daitekeen moduan, MAA/PEGMA erlazio bakoitzerako, PEGMAren albo-katearen luzera edozein izanda, erlazio lineal bat lortzen da. Hau guztiz bat dator Marchon eta lankideek (2017) aurkeztu zutenarekin. Aipagarria da, bestalde, azterketa bera fase kristalino banatuetan egiten denean (ikus 6. irudia) ez dela gauza bera ikusten. Kasu honetan ere, MAA/PEGMA erlazio bakoitzak karboxilato-dosiarekin erlazio lineala azaltzen du. Alabaina, PEGMAren albo-katearen luzera desberdina denean, malda desberdina lortzen da, OPCaren kasuan ez bezala.

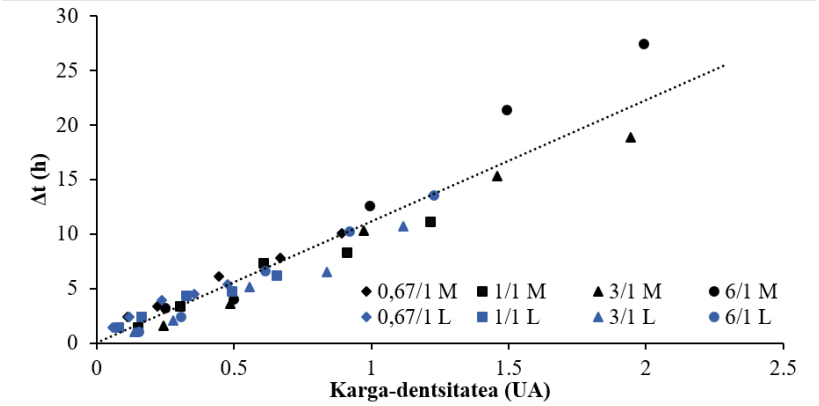
6. irudia. Zementuaren fase kristalioen hidratazioaren atzerapena konposizio desberdina daukaten PCE dosiaren aurrean. C_3S (belita) goian eta C_3A (kaltzio aluminaoa) behean.



5. irudian erakutsitako emaitzak Marchon eta abarren lanarekin bat datozenez, haiek egin zuten modura, hidratazio-denboraren atzerapena karga-dentsitatearen aurrean irudikatu dugu 7. irudian, karga-dentsitatea 2. ekuazioan erakusten den moduan kalkulatuz. Ikusten den modura, puntu guztiak kurba nagusi batean elkartzen dira. Analisi hau ezin izan da egin 6. irudian aurkeztutako emaitzekin, bertan jada emaitzak bat ez zetoztela ikusten baitzen.

$$\text{Karga dentsitatea} = \frac{c_{PCE}}{M_{RU}} \left(\frac{C/E}{C/E + 1} \right)^{3/2} \quad (2)$$

7. irudia. Sintetizatutako PCEek OPC komertzial batean eragindako hidratazioaren atzeratzearen kurba nagusia



4. Ondorioak

Lan honetan, zementuaren industrian oso erabiliak diren PCE superplastifikatzaileak sintetizatu eta karakterizatu ditugu. Ikusi den moduan, erabilitako MAA/PEGMA erlazioaren arabera, eta PEGMAren albo-katearen luzeraren arabera, konformazio desberdina zeukaten kateak lortu dira. Ondoren, gehigarri hauek OPC zementu komertzial batean, eta hura osatzen duten fase kristalino desberdinetan zer eragin daukaten aztertu da, hidratazio-kalorimetriaren bidez.

OPCaren kasua aztertzean, Marchon eta lankideek ikusitakoa berretsi dugu, hidratzioaren atzerapena karga-dentsitatearekin lotzen duen kurba nagusi bat lortuz. Fase kristalino desberdinak banaka atzeratzean, ikusi da OPCan argi ikusten diren egitura-propietate erlazioak ez direla betetzen eta ikerkuntza gehiago behar dela fase bakoitzaren hidratazio-mekanismoa guztiz ulertzeko.

5. Etorkizunerako planteatzen den norabidea

Lanaren azken atalean erakutsi den moduan, OPCan argi ikusten ditugun egitura-propietate erlazioak ez dira betetzen fase kristalinoak banaka aztertzen ditugunean. Garrantzitsua da, hortaz, lerro horretan azterketa sakonagoa egitea, mekanistikoki egon daitezkeen desberdintasunak ulertzeko asmoz.

6. Erreferentziak

Emaldi, I., Agirre, A., Etxeberria, A., Erkizia, E., Dolado, J. S., & Leiza, J. R. (2020). Characterization of Comb Shaped MAA-co-PEGMA Copolymers Synthesized by Free-Radical Polymerization. *Macromolecular Reaction Engineering*, *14*(6), 1–10. https://doi.org/10.1002/mren.202000015

Emaldi, I., Erkizia, E., Leiza, J. R., & Dolado, J. S. (2022). Understanding the effect of MPEG-PCE's microstructure on the adsorption and hydration of OPC. *Journal of the American Ceramic Society*, *July 2022*, 2567–2579. https://doi.org/10.1111/jace.18912

Flatt, R. J., Schober, I., Raphael, E., Plassard, C., & Lesniewska, E. (2009). Conformation of adsorbed comb copolymer dispersants. *Langmuir*, *25*(2), 845–855. https://doi.org/10.1021/la801410e

Gay, C., & Raphaël, E. (2001). Comb-like polymers inside nanoscale pores. *Advances in Colloid and Interface Science*, *94*(1–3), 229–236. https://doi.org/10.1016/S0001-8686(01)00062-8

Marchon, D., Juilland, P., Gallucci, E., Frunz, L., & Flatt, R. J. (2017). Molecular and submolecular scale effects of comb-copolymers on tri-calcium silicate reactivity: Toward molecular design. *Journal of the American Ceramic Society*, *100*(3), 817–841. https://doi.org/10.1111/jace.14695

7. Eskerrak eta oharrak

Autoreek Green Concrete LTC, Eusko Jaurlaritza (GV-IT1525-22), MINECO (PID2021-123146OB-I00) eta Euskal Herriko Unibertsitatea eskertu nahi dituzte.

Akronimo zerrenda

AF4	Fluxu-Asimetrikoko Fluxu-Eremuko Zatikapena
C_2S	Belita minerala
C_3A	Kaltzio aluminato minerala
C_3S	Alita minerala
EO	Etilen oxido
MAA	Azido metakrilikoa
n	PCE batean, unitate errepikakor kopurua
N	PCE batean, segmentu bakoitzaren karga-dentsitatea
OPC	Ordinary Portland Cement (Portland zementua)
P	PCE batean, EO kopurua
PCE	Polycarboxylate ether
PEGMA	Polietilen glikol metakrilatoa

Nafarroako Aratxea izendapenean gizendutako animalien ongizatea: Elikadura konbentzionala vs Azpiproduktu begetalak

Aroa Romero [1], Pablo González[1], Sara León-Ecay[1], Irantzu Goenaga[1,2], José Antonio Mendizabal[1], Kizkitza Insausti[1]

[1] Nekazaritza Ingeniaritzako eta Biozientzietako GMET-ISFOOD, Nafarroako Unibertsitate Publikoa (NUP), Iruña, [2]Tratamiento Subproductos Agroalimentarios, S.L. (TRASA), Milagro (Nafarroa)
gonzalez.127875@e.unavarra.es

Laburpena

Ikerketa honetan, Nafarroako Aratxea izendapenean (BIG, Babestutako Izendapen Geografikoa) ekoiztutako Piriniar arrazako txekorren ongizatea ebaluatu zen gizendegi komertzial batean. Helburu nagusia elikadurak ongizatean izan dezaken eragina aztertzea izan zen, bi elikadura mota alderatuz, bata pentsu eta lastoan oinarritutakoa (kontrola) eta bestea azpiproduktu begetaletan oinarritutakoa. Ustiategiaren barruan, 4 txekor talde ebaluatu ziren, 6 animalia bakoitzeko (bi kontrol dietarekin eta bi azpiproduktuetan oinarritutako dietarekin). Oro har, ondoriozta daiteke ongizatea egokia izan zela talde guztietan, pentsu mota edozein dela ere, eta horrek atea irekitzen dio azpiproduktu begetalak animalien elikaduran erabiltzeko aukerari.

Gako-hitzak: Animalien ongizatea, txekorren gizentzea, Nafarroako Aratxea izendapena.

Abstract

In this study, the welfare of Pininear young bulls, reared under the PGI Ternera de Navarra, was evaluated in a commercial fattening farm. The main objective was to analyze the effect of feeding on animal welfare, comparing two diets, one based on fodder and straw (control) and the other based on vegetable by-products. Within the farm, 4 groups of calves were evaluated, 6 animals per group (two fed on a control diet and two based on by-products). In general, it can be concluded that the welfare was adequate in all feed lots, regardless of the type of feed, which opens the door to the possibility of using vegetable by-products in animal rationing.

Key words: Animal welfare, beef feedlot, PGI Ternera de Navarra.

1. Sarrera eta motibazioa

Nafarroako nekazaritzako elikagaien industriak 120.000-150.000 tona/urteko azpiproduktu inguru sortzen ditu, eta horrek benetako kudeaketa arazo bat suposatzen du bolumenagatik eta dauden balorizazio aukera gutxigatik. Egoera horri aurre egiteko, proposatzen den alternatibetako bat Nafarroako nekazaritzako elikagaien industrian sortutako azpiproduktu begetalak txekorrak gizentzeko lehengai alternatibo gisa erabiltzea da.

Azterketa hau BEEF+ proiektuaren barruan dago, eta haragi osasuntsua lortzea eta bere ekoizpen-prozesua animalien ongizatearen eta jasangarritasun-irizpidetan oinarrituz balioestea du helburu.

1.1. Animalien ongizatea

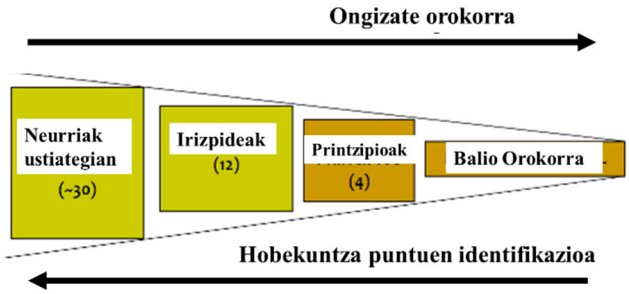
Animalien ongizatea zehaztea zaila da, alderdi sozial, kultural, erlijioso eta/edo etiko asko barne hartzen dituelako. Definiziorik berriena ANSESek (2018, Elikagaien Segurtasun Sanitariorako Agentzia Nazionala, Frantzia) proposatutakoa da: "Animaliaren ongizatea egoera fisiko eta psikiko positiboa da, alderdi fisiologiko eta portaeren asebetetzeari lotutakoa, baita euren itxaropenak asebetetzen dituena ere. Egoera hori animaliak egoeraz duen pertzepzioaren arabera aldatzen da".

Farm Animal Welfare Committee-ren arabera , FAWC (Benn, 1992), animalien ongizatea betetzen dela bermatzeko 5 askatasun bermatu behar dira: Gose eta egarririk eza, Ingurune egokia eta erosoa, Gaixotasunik, mina eta lesiorik ez izatea, Espeziearen jokaera normala adierazteko gaitasuna izatea, Sufrimendu mentalik eza (beldurra edo larritasuna). Askatasun horiek oinarritzat hartuta, Welfare Quality (WQ) protokoloa sortu zen. Protokolo hau Europako proiektu baten emaitza da, non animalien ongizatearen ebaluaziorako oinarri zientifikoko tresna bat garatzea zen helburu. Protokolo hau 12 irizpidetan garatutako 4 printzipiotan oinarritzen da (1. taula). Irizpide bakoitza baloratzeko, adierazle edo neurri objektiboak eta fidagarriak proposatu dira. Adierazle horiek ustiategian ebaluatzen dira. Horrela, neurri horietan oinarrituta, kontsumitzaileari informazioa ematen dion ongizate-balio batera iristen da eta, aldi berean, ekoizlearentzat hobekuntza-tresna gisa balio du, hobekuntza puntuak erraz identifikatzea ahalbidetzen duelako (1. irudia).

1. taula. Welfare Quality (WQ) ongizatea ebaluatzeko protokoloaren printzipioak eta irizpideak.

Animalien ongizatearen printzipioak	Animalien ongizatearen irizpideak
Elikadura ona	Gose luzerik ez izatea
	Egarririk ez luzea
Ingurune egokia	Erosotasuna atsedenaldian
	Erosotasun termikoa
	Mugitzeko erraztasuna
Osasun ona	Lesiorik eza
	Gaixotasunik eza
	Manipulazioak eragindako mina eza
Jokabide egokia	Jokabide sozialen adierazpena
	Beste jokabide batzuen adierazpena
	Animalia-giza harreman ona
	Egoera emozional positiboa

1. irudia. Welfare Quality (WQ) eskema



1.2. Nafarroako Aratxea BIG eta Pirinear arrazako txekorrak

Nafarroako Aratxea BIG-ak Nafarroan jaiotzen direnetik hiltegira arte ekoiztutako txekorren ekoizpena babesten du. Zehaztapen liburuan honako arrazak onartuta daude: Piriniar arraza (2. Irudia), Parda Alpina, Blonde d'Aquitaine , Charolais, eta haien arteko gurutzaketak. Kontuan izan behar da BIG honen arabera ekoizten den haragiaren %90 arraza Pininiarra dela (CE nº 510/2006)..

Piriniar arraza tradizio handikoa da Nafarroako eta Euskal Herriko iparraldean bere haragi onagatik eta amatasun gaitasunagatik (Mendizabal, 2005). Urteetan zehar bere historia oso aldakorra izan da, ia desagertu egin zen beste arraza produktiboago batzuek ordezkatu zutelako. Gaur egun, animalia honen egoera hobetu egin da arrazaren genetika hobetzeko Liburuak eta Programen ardura duen Ekoizleen Elkarteen sorrerarekin (CONASPI, d.g.).

2. irudia. Piriniar arrazako animaliak.

1.3. Txekorren elikadura

Lan honetan bi elikadura alderatzen dira, kontzentratuetan oinarritutako sistema konbentzionala eta azpiproduktu begetalekin egindako mikro-siloak.

Lehenengoa zerealez, zereal-azpiproduktuez eta proteina-bazkariez osaturiko kontzentratuetan oinarritzen da. Gehien erabiltzen diren zerealak garagarra eta artoa dira (Díaz, 2019).

Bigarrena azpiproduktu begetalekin fabrikatutako mikro-siloetan oinarritzen da. Hauek nekazaritzako elikagaien industrien hondakin organikoak eta beste zenbait zereal eta lastoa nahastuz fabrikatzen dira. Horrela, konponbide gisa, hondakin horiek animaliak elikatzeko pentsu bihurtu ahal izango dira, potentzialki onura ekonomikoak eta ingurumenekoak sortuz (Marcos, 2020).

Esperientzia hau aurrera eramateko motibazioa elikadura-aukerak hobetzea da, eta, bide batez animalia ustiapen-kostu nagusia hobetzea da. Lan honek animalien elikaduran azpiproduktu begetalen erabileraren bideragarritasun teknikoa eta ekonomikoa frogatzea du helburu, eta, kasu zehatz honetan, animalien ongizatean duen eragina. Gainera, azpiproduktuen erabilerak baliabideen ekonomia zirkularra planteatzen du.

Laburbilduz, BEEF+ proiektuak haragiaren propietate osasungarrien bila prozesuari eta produktuari balio erantsi handiagoa ematea espero du, ziklo arduratsu, errentagarri eta jasangarri baten bidez, kontsumitzaileen asebetetze maila eta sektorearen irudia hobetzen dituena, horrela txekor-haragiaren kontsumoa sustatzen lagunduz.

2. Arloko egoera eta ikerketaren helburuak

Gaur egun, animalien elikaduraren kostuak nabarmen handitu dira, eta horrek etxalde askok beraien produktuak produkzio-kostuetatik beherako prezioetan saltzea eragiten du. Ekoizleak kanpotik datozen lehengaien menpe gutxiago izatea ahalbidetzen duten alternatibak bilatzea elikagaien kostuak murriztuko lituzke eta prozesuaren ingurumen-inpaktuan eragin positiboa izango luke. Beraz, lan honen helburua Nafarroako Aratxea BIGren pean babestutako Piriniar arrazako txekorren ongizatea ebaluatzea izan da , elikadurak ongizatean duen eragina alderatuz. Horretarako, bi dietarekin elikatu dira animaliak, bata pentsu eta lastoan oinarritutako eta bestea Nafarroako Erriberako nekazaritzako elikagaien industrietako azpiproduktu begetaletan oinarritutakoa.

3. Ikerketaren muina

3.1. Materiala eta metodoak

Lan hau Iruñerriko gizendegi komertzial batean egin zen, Piriniar arrazako 24 txekorrekin, 6 animaliako 4 taldeetan banatuta. Bi talde azpiproduktu begetalekin (siloko lehengaien %38, 3. irudia) prestatutako mikro-siloan oinarritutako elikagaiez hornitu ziren (1. eta 2. taldeak) eta beste

biak ohiko pentsuetan eta lastoan oinarrituta (3. eta 4. taldeak). Gizentzea animaliek batez beste 251,04 egun bizi eta 355,75 kg pisu bizi zutenean hasi zen eta batez beste 389,75 egun eta 537,29 kg bizi pisuarekin amaitu zen.

3. irudia. Azpiproduktu begetalak eta mikro-siloak

Azpiproduktu begetalak Mikro-siloak

Animalien ongizatea *Welfare Quality: Assessment protocol for cattle* protokoloari jarraituz ebaluatu zen.

Animalien ongizatearen neurketak 5 egunetan egin ziren txekorren gizentze fasean (2022ko martxoa eta apirila bitartean). Baserria bisitatzeko egun bakoitzean, gutxi gorabehera 20-25 minutuko behaketak egiten ziren talde bakoitzeko. Hortik 15 minutu animalien jokabidea soilik behatzera zuzenduta zeuden. Gainerako denboran, animaliei zein instalazioei lotutako beste neurri edo adierazle batzuk baloratu ziren.

Baserrian datu guztiak bilduta, Excel orri batera pasa ziren. Ondoren, WQ ongizate protokoloak eskaintzen duen erabilera irekiko simulagailuan sartu ziren (https://www1.clermont.inrae.fr/wq/?simu=on). Horrela, Printzipioak 1-100 eskalan neurtzen dira eta Azken Ebaluazioa Ez Sailkatua, Onargarria, Hobetua, Bikaina eskalan ematen da. Behin azken emaitzak lortuta, datu hauek SPSS programako bariantza-analisia (ANOVA) erabiliz aztertu ziren, elikadurak animalien ongizatean duen eragina aztertzeko.

3.2. Lortutako emaitza esanguratsuenak

Printzipio bakoitzerako lortutako emaitzak honako hauek izan ziren:

<u>Elikadura onaren printzipioa</u>:

Lehenengo printzipioaren barruan, gorputzaren egoera eta ur-hornidura behatu ziren.

Gorputzaren egoera kasu guztietan ona zen eta ez zen animalia argalen frogarik ikusi. Ur-hornikuntzari dagokionez, 1. taldeak 6 txekorrentzako buia ontzi bat zeukan garbia eta egoera onean. Eta 2., 3. eta 4. taldeen kasuan bainuontziak izan zituzten. Hauek partzialki garbitzat hartzen ziren bainuontziak garbiak zeudelako baina ura zikin samarra zegoelako.

<u>Inguru egokiaren printzipioa</u>:

Bigarren printzipioan, etzateko behar den denbora, animalien garbitasuna, pisu bizian oinarritutako azalera ezaugarriak eta larreetarako edo kanpoko atsedenetarako sarbideak ikusi ziren.

Etzan egiteko denbora 4 eta 5 segundo artekoa izan zen. Hau positiboa da protokoloak gehienez 6 segundo ezartzen dituelako. Animalien garbitasuna aztertzeko, protokoloko argazkiak erreferentzia gisa hartu ziren eta animaliak garbi zeudela ikusi zen. Egoitzaren ezaugarrietarako, egoitza bakoitzeko batez besteko animalien pisu bizia (hilean behin pisatu ziren) eta egoitzaren neurriak hartu ziren kontutan eta neurriak WQ protokoloan ezarritako irizpideen arabera onargarriak zirela baieztatu zen.

Osasun onaren printzipioa:

Kasu honetan, manipulazioak eragindako lesiorik, gaixotasunik eta minik ez dagoela aztertu zen.

Hiru animalia herren baino ez ziren aurkitu, bi 4. taldean eta 1. Taldean beste bat, eta ilerik gabeko orbanak dituzten zazpi animaliak ikusi ziren, baina lesio larririk gabe. Gaixotasunik ezaren barruan, eztulak zenbatu ziren batez ere. Behaketa bakoitzeko zenbatutako eztul kopurua 0 eta 4 artean egon zen eta balio horiek bakarrik gainditzen ziren 4. taldean lehenengo egunetan. Sudur- eta begietako isurketak ere lehenengo egunetan ikusi ziren, izan ere, kasu askotan animaliaren immunitate-sistemaren araberakoa denez, zenbat eta txikiagoak izan, orduan eta aukera gehiago arazo hauek jasateko.

Manipulazioak eragindako minik ezagatik, baliorik onenak lortu ziren, animalietako bat ere ez baitzen kastratu edo adar-gabetu, ezta buztanik moztu ere.

Jokabide egokiaren printzipioa:

Azkenik, laugarren printzipioaren barruan, jokabide agonistikoak, jokabide kohesionatuak, animalia-giza harremana eta animalien aldarteak neurtu ziren.

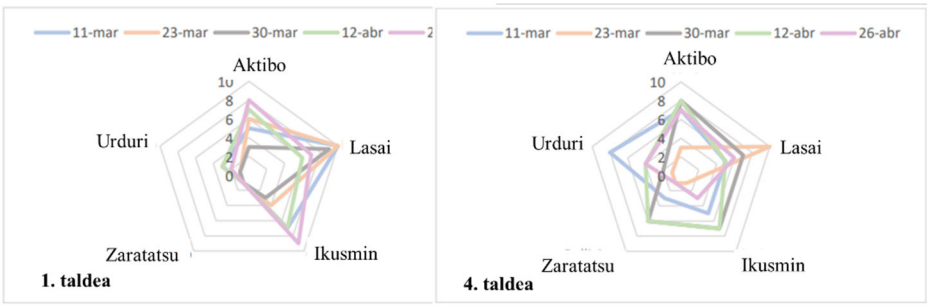
Jokabide agonistikoen barruan, batez ere, buruko kolpeak aurkitu ziren talde guztietan. Desplazamenduak askoz gutxiago gertatu ziren, borrokak ia ez ziren ikusi, 2. taldean egun berean bi ikusi zirelarik. Adarkadaren kasuan, hauek behaketen hasieran antzeman ziren batez ere, eta kasu askotan animalia berak eragindakoak izan ziren.

Azkenik, printzipio honi estaltze jolasak gehitu zitzaion eta batez ere 4. taldean gertatu ziren lehenengo behaketan eta 2. taldean behaketaren laugarren egunean. Jokabide kohesionatu gisa, haien arteko miazketak kontuan hartzen ziren eta 2. eta 3. taldeetan gertatu ziren batez ere.

Animalia-giza harremana, animaliak nekazari gerturatzerakoan duen ihes distantzia neurtuz baloratu zen. Kasu gehienetan 2 edo 3 animalia ukitzea posible izan zen eta behaketak aurrera egin ahala, ukitutako animalien kopuruak ez zen handitu, baina animaliak gehienbat gutxiagoko ihes-distantzian kontzentratzen ziren 50 cm-tara, eta horrek adierazten du animaliak eroso sentitzen zirela baserritarraren aurrean.

Animalien aldarteari dagokionez, 5 aldarte-egoera baino ez ziren ikusi WQ protokoloak proposatzen dituen 20etatik, denak ebaluatzearen konplexutasuna ikusita. Erabilitako eskala 1-10eko intentsitatekoa izan zen. Aldarte lasaia izan zuten orokorrean, baina 4. taldean zalaparta eta egonezina apur bat gehiago ikusi zen, 4. irudian ikus daitekeen moduan.

4. irudia. Jokaeraren ebaluazioa 1. eta 4. taldeetan.



Lau printzipioetan animalien ongizatea taldeka alderatzean, ondoriozta daiteke ikerketa honen baldintzetan, elikadura motak ez zuela eragin handirik izan animalien ongizatean eta talde guztiek ongizate-maila onargarria aurkeztu zutela (Elikadura ona P = 0.000, Inguru egokia P = 0,693, Osasun ona P = 0,461, Jokaera egokia P =0,693). Elikaduran ikusi zen eragina berriz, uraren

erabilgarritasunarekin lotutako irizpideekin ulertu daiteke (2. taula), 2. 3. eta 4. taldeetan bainuontziak partzialki garbi zeudela kontutan hartuta.

2. taula. WQ simulagailuak 2022/03/11 eta 2022/04/26 egunetarako lortutako emaitzak.

Printzipioak	1.taldea mikro-silo	2 taldea mikro-silo	3. taldea Konbentzionala	4. taldea Konbentzionala
2022/11/03				
Elikadura ona	56,76	34.68	34.68	34.68
Ingurune egokia	100	100	100	100
Osasun ona	64,72	99.9	65.09	64.41
Jokaera egokia	14.15	16.26	17.44	12.07
Balio orokorra	Onargarria	Hobetua	Hobetua	Onargarria
2022/04/26				
Elikadura ona	56,76	34.68	34.68	34.68
Ingurune egokia	100	100	100	100
Osasun ona	99.9	99.9	99.9	94.48
Jokaera egokia	19.11	18.61	18.29	27.7
Balio orokorra	Hobetua	Hobetua	Hobetua	Hobetua

Printzipioak: 1-100 eskala. Balio orokorra: eskala Ez sailkatua, Onargarria, Hobetua, Bikaina

Ingurune egokiari dagokionez, emaitza guztiak oso positiboak izan ziren.

Osasun onari dagokionez, hasieran baxu samarra zen, batez ere eztula eta sudur- eta begietako isurketa agertzeagatik, 2. taldean izan ezik, animalia gazteenetan. Hala ere, denborarekin hobetzen joan zen talde guztietan.

Azkenik, Jokaera egokiaren ebaluazioa balio baxuekin agertzen da tauletan, esan bezala, protokoloan eta simulagailuan jasotako 20 alderdietatik 5 baino ez baitziren ebaluatu. Hala ere, 4. irudian ikusten den bezala, animaliak erlaxatuta eta aktibo zeuden gizentze garaian.

4. Ondorioak

Lortutako emaitzek erakusten dute elikadurak ez zuela eragin handirik izan ebaluatutako ongizate-adierazleetan, emaitzak antzekoak izan zirelako bi kasuetan. Gainera, talde guztietan, ongizate balioa orokorra egokia izan zen, "Onargarria"tik "Hobetua" arteko balorazioekin, animaliak ia beti lasai egon zirelarik.

Horrela, guzti honekin, printzipio eta irizpideei dagokienez egin beharreko hobekuntza nagusia honako hau litzateke: Edalontziak hobetu, batez ere bainuontzi motakoak, talde bakoitzeko aurkitutako animalien kopuruagatik txikiak baitira, eta hauen garbiketa arretatsuagoa egiteaz gain, ura zikindu ez dadin. Buia ontzi motakoen kasuan , komenigarria izango litzateke ukuiluan beste batzuk gehitzea, txekor guztientzako bakarra baitzegoen.

5. Etorkizuna

Animalien ongizatearen ebaluazioak erakutsi zuen aztertutako bi dieta ezberdinek ez zutela eragin handirik izan ebaluatutako ongizate-adierazleetan. Era berean, eta BEEF+ proiektuan bildutako beste datu batzuen arabera, agerian geratu da bai ustiategiko indize teknikoek bai lortutako haragiaren kalitateak ez dutela alde handirik agertzen bi taldeen artean. Gainera, animalien elikaduran azpiproduktu begetalen erabilerarekin lotutako ingurumen-inpaktu txikiagoa (ura eta karbono-aztarna) aurkitu da.

Beraz, azpiproduktu begetalen erabilerak nekazaritzako elikagaien industriaren eta abeltzaintzaren sektorearen arteko ekonomia zirkular baten adibidea erakusten du, alternatiba interesgarri eta errentagarri bat suposatzen duena, eta sektorearen eta kontsumitzailearen egungo beharrekin guztiz bat datoz.

Jarraian egiten den proposamena beste abere-talde batzuetan elikagai mota hori probatzea da eta ekoizleei azpiproduktu begetalen onurak ezagutaraztea da.

6. Erreferentziak

Benn, L. J. (2009). Farm Animal Welfare in Great Britain: Past, Present and Future. Farm Animal Welfare Council, 2-4.

CONASPI. (s.f.). Confederación de Asociaciones de Ganado Vacuno Pirenaico. Obtenido de http://www.conaspi.es/vercontenido.asp?conid=11359&tipconid=22&menid=&web=22

Díaz, F. (2019). Estrategias de alimentación de los terneros de Cebo. Cría y Salud, Vol. 79, 39-42.

Marcos, C. N. (2020). Effects of agroindustrial by-product supplementation on dairy goat milk characteristics, nutrient utilization, ruminal fermentation, and methane productions. Journal Diary Science, 103(2), 1472-1483.

Mendizabal, J.A. (2005). Aportaciones a la historia de la raza vacuna pirenaica. Paradigma de la zootecnia española. Archivos de zootecnia,205, 39-50.

Organización Mundial de Sanidad Animal [OIE]. (2021). Obtenido de Bienestar Animal: https://www.woah.org/es/que-hacemos/sanidad-y-bienestar-animal/bienestar-animal/

Welfare Quality: Assessment protocol for cattle
http://www.welfarequalitynetwork.net/media/1088/cattle_protocol_without_veal_calves.pdf

7. Eskerrak

Ikerketa hau Nafarroako Gobernuak eta Eskualde Garapenerako Europako Funtsak (FEDER) finantzatu dute BEEF+ proiektuarekin I+G proiektuen deialdiaren esparruan (0011-1365 -2020-000288).

Egileek eskerrak ematen nahi dizkiote Javier Iraizoz Ibarrolari (Azoz , Nafarroa) ebaluazioak behi-gizendegian egitea posible izateagatik.

X Izpien Mikrofluoreszentzia tresna gisa mikroplastikoetan dauden sugar-atzeratzaileen migrazioa monitorizatzeko: akrilonitrilo butadieno estireno eta deka-209-aren kasua

Egoitz Fraga-Lopez[1], Ainara Gredilla Altonaga[1], Olivia Gomez-Laserna[1], Alberto de Diego[1,2]

1. Kimika Analitikoa Saila (Euskal Herriko Unibertsitatea, Leioa, Euskal Herria)

2. Plentziako Itsas Estazioa (PIE) (Euskal Herriko Unibertsitatea, Plentzia, Euskal Herria)

efraga004@ikasle.ehu.eus

Laburpena

Mikroplastikoak (MP) ingurumenerako gai arriskutsutzat hartzen dira dauzkaten gehigarriak askatzeko eta bestelako kutsatzaileak garraiatzeko eta kontzentratzeko gai direlako. Sugar-atzeratzaile polibromatuak (BFR) plastikoetan asko erabiltzen diren gehigarriak dira eta ikerketek erakusten dute behin ekosistemetara isurtzen direnean efektu toxiko nabarmenak dituztela. Lan honetan akrilonitrilo butadieno estirenozko (ABS) MP-tan dagoen Deka-209-aren migrazioan gazitasunak eta erradiazio ultramoreak duten eragina aztertzen da ur-sistema natural bat simulatuz, X izpien mikrofluoreszentzia (μ-XRF) analisi-teknika gisa erabiliz. Horrela, gazitasun baxua eta UM erradiazioaren presentziak BFRaren migrazioa errazten dutela frogatu da.

Hitz gakoak: mikroplastikoak, sugar-atzeratzaile polibromatuak, XRF, migrazioa, ingurumena.

Abstract

Microplastics (MPs) are considered dangerous for the environment because they can release their additives and concentrate pollutants from the environment. Brominated flame retardants (BFRs) are widely used as additional compounds in all kinds of plastics and studies show that they have highly toxic effects. This work focuses on studying the influence of salinity and ultraviolet radiation on the migration of Deca-209, contained in MPs of acrylonitrile butadiene styrene (ABS) simulating a natural water environment, using the X-ray microfluorescence (μ-XRF) technique as an analysis method to monitor the whole process. The results showed that the presence of low salinities and UV radiation makes the migration of the FR easier.

Keywords: microplastics, brominated flame retardants, XRF, migration, environment.

1. Sarrera eta motibazioa

Plastikoen munduko ekoizpena nabarmen hazi da azken urteotan. 1950. urtean hasi zenetik gaur egun arte, 8,3 mila milioi tona plastiko inguru fabrikatu dira. Zehazki, 2018an, 368 milioi tona ekoiztu ziren munduan[1], eta horietatik 61,8 milioi Europan ekoiztu ziren[2]. Erabilienetarikoen artean polipropilenoa (PP), polibinil kloruroa (PVC), polietilenoa (PE) eta poliestirenoa (PS) daude. Honetaz gain, ingeniaritzako plastikoak ekoiztea ere ohikoa da, hau da, oinarrizko plastikoen unitate monomerikoetatik eratorritako plastiko konposatuak egitea, banako homologoen prestazioak hobetzeko helburuarekin. Akrilonitrilo butadieno estirenoa (ABS) da hauen adibiderik erabiliena. Izan ere, azken honek dituen propietateei esker, autoen, etxetresna elektrikoen, ordenagailuen, telefonoen eta etxeko objektuen piezetan, jostailuetan, etab. erabiltzen da[3]. Datuak ikusita, plastikoen erabilera desegokiak eta beraien izaera ez-biodegradagarriak eragiten dituen ingurumen- eta hondakinen kudeaketa-arazoak agerikoagoak dira (Zhang et al., 2019). Horrela, gaur egun saihestezina da plastikoak ingurumenean hondakin gisa amaitzea, ur-, aire- eta lur-sistemetan finkatuz, ibai eta atmosfera bidezko garraioaren ondorioz. Izan ere, gaur egun ozeanoetan 75 eta 199 bitarteko milioi tona plastiko daudela kalkulatzen da (UN Environment Programme, 2022). Arazo hau larriagotu egiten da, gainera, zatiketa-mekanismo natural ezberdinen ondorioz, hala nola itsasoko uhinak edo erradiazio ultramoreak (UM)[4],

1 https://www.plasticsoupfoundation.org/en/plastic-facts-and-figures/
2 https://es.greenpeace.org/es/trabajamos-en/consumismo/plasticos/datos-sobre-la-produccion-de-plasticos/
3- https://tecnologiadelosplasticos.blogspot.com/2011/06/abs.html

mikroplastiko (MPs) izeneko plastiko txikiagoak ekoizten direlarik. MPen tamaina txikiak ingurunean barreiatzea errazten du, baita kaltetutako ekosistemako izaki bizidunek irensteko arriskua areagotzen du, horrela, haien gorputzetan metatu egiten direlarik kate trofikoaren bidez birbanatuz (Bergmann et al., 2015).

MP-ak ingurumenerako gai arriskutsutzat hartzen dira, alde batetik, haien jatorri petrokimikoagatik eta, beste aldetik, baldintza batzuetan haien fabrikazioan erabiltzen diren gehigarriak askatzeko eta beste batzuk bereganatzeko gai direlako. Ondorioz, kutsatzaileen biltegi bezala eta hedapen bektore gisa identifikatu dira. MPen toxikotasuna esposizio-ingurune jakin batean, plastiko-motaren, kutsatzailearen eta "plastiko-kutsatzaile" sistemaren migrazio-ahalmenaren araberakoa da. Hori dela eta, egungo ikerketek ingurumeneko konpartimentu bakoitzean zer plastiko mota aurkitzen diren identifikatzeaz eta kuantifikatzeaz gain, hauek kutsatzaileak harrapatzeko eta/edo askatzeko duten ahalmena aztertzen dute (Bergmann et al., 2015; Jovanovic, 2017; Luo et al., 2022).

2. Arloko egoera eta ikerketaren helburuak

Gaur egun, eremu zehatz batean plastikoaren aplikazioak dituen beharren arabera, edo, besterik gabe, helburu estetikoengatik, gehigarriak sartzen zaizkie. Ohikoenen artean tindagaiak, egonkortzaileak (beroa, hidrolisia eta argi ultramorearen efektuak murrizteko gehituak normalean), lubrifikatzaileak eta sugar-atzeratzaileak (FR, *Flame retardant* ingelesez) daude[5]. Azken hauek guztiz beharrezkoak dira plastiko gehienentzat, bere sukoitasun edo errekortasun nabarmena dela eta (He et al., 2020). FR-ak plastikoetan erreaktibo edo gehigarri gisa gehi daitezke. Erreaktibo motako sugar-atzeratzaileek egituran zenbait talde dituzte plastikoen monomeroekin erreakzionatzeko eta hortaz, hau kopolimerizatzeko. Era honetan haien egituran ainguratuta geratzen dira eta, beraz, jatorrizkoaren ezberdina den plastikoaren egitura molekularra sortzen dute.

Gehigarri motako sugar-atzeratzaileak dira gehien erabiltzen direnak, baina haien egiturak ez du matrize plastikoa ainguratzeko aukerarik ematen. (Owen eta Harper, 1999). Hauen egitura kimikoaren arabera, ez-organiko eta organiko gisa sailka daitezke (Morgan eta Gilman, 2013). Izaera ez-organikoa dutenek, hala nola, metal hidroxidoek (adibidez, aluminio hidroxidoa eta magnesio hidroxidoa), munduko sugar-atzeratzaile ekoizpen osoaren %50a osatzen dute (Xiaonan et al., 2017; Shen et al., 2021; Posner, 2009). Izaera organikoa dutenen artean, aldiz, konposatu halogenatuetan (bromatuak eta kloratuak) eta fosfato halogenatuetan oinarritutakoak nabarmentzen dira. Bromodunak oso erabiliak dira polimero termoplastikoen (tenperatura altuak aplikatuz nahi adina aldiz molda daitezkeenak) eta termoegonkorren (tenperatura altuetan behin bakarrik molda daitezkeenak) ekoizpenean.

Gaur egun gehien erabiltzen diren FRak konposatu halogenatuak dira, zehazki, konposatu polibromatuak (BFRak, *Brominated Flame Retardants* ingelesez), eta lau mota nagusitan sailka daitezke:

- Difenil-eter polibromatuak (PBDE, *Polybrominated diphenyl ethers* ingelesez).
- Hexabromoziklododekanoak (HBCDDak, *Hexabromocyclododecanes* ingelesez).
- A tetrabromobisfenola (TBBPA, *Tetrabromobisphenol A* ingelesez) eta beste fenol batzuk.
- Bifenilo polibromatuak (PBB, *Polybrominated biphenyls* ingelesez).

Europar Batasunean BFR batzuen erabilera debekatuta edo mugatuta egon arren, beste batzuk oraingoz komertzializatzen dira. Gainera, ingurumenean biltegiratzeko ahalmena duten konposatuetan daudela kontuak hartuta, hots MPetan, gaur egungo gizartean produktu kimiko hauek eragiten dituzten arriskuei buruzko kezka nabarmena da. BFRz aberastutako MPak gai dira BFRak ingurunera isurtzeko, airea, lurzorua edo/eta ura kutsatuz. Gainera, kate-trofikoan sar daitezke animalia-jatorrizko elikagaietan (arraina, haragia, esnea eta eratorritako produktuetan) barneratuz. Izan ere, behin ingurumenean daudela, hainbat animalia horiek irensteko gai dira (Bergmann et al., 2015; EFSA, 2021). Hori dela eta, Europar Batasunak osasuna eta ingurumena babesteko legedia onartu du, BFR batzuen salmenta eta erabilera murriztuz edo geldiaraziz.

4 https://es.greenpeace.org/es/trabajamos-en/consumismo/plasticos/como-llega-el-plastico-a-los-oceanos-y-que-sucede-entonces/

5 https://omnexus.specialchem.com/selection-guide/acrylonitrile-butadiene-styrene-abs-plastic

Horrela, 2003/11/EE Zuzentarauak, zenbait substantzia eta prestakin merkaturatzearekin eta erabiltzearekin erlazionaturiko arriskuei buruzkoa dena, PBDEen familiako bi nahaste komertzial, pentaBDE eta oktaBDE izenez ezagutzen direnak hain zuzen ere, % 0,1 baino kontzentrazio altuagotan (masan) saltzea debekatzen du ingurumenean duten biometatze-ahalmenagatik (EFSA, 2021). 2006ko uztailetik aurrera, 2002/95/EE Zuzentarauaren arabera, ekipo elektriko eta elektroniko berriek ezin dute PBBrik edo/eta PBDErik eduki kontzentrazioa edozein izanda ere. 2008ko uztailean, Europako Justizia Auzitegiak hirugarren PBDE nahasketa bat ere debekatu zuen, Deka-209, hasiera batean murrizketetatik salbuetsita zegoena bere ustezko toxikotasun baxua zela eta (EFSA, 2021). Izatez, Deka-209 legegintza-mailan azterketa jaso berri du, baina ez bere toxikotasunarekin lotutako arrazoiengatik. Izan ere, bromo-portzentaje altua eta bioaktibitate txikia daukala kontuan hartuta, antzekoak diren BFRak baino xurgapen txikiagoa du, azkar ezabatzen da eta ez da biometatzen, bere arriskuak oharkabean utziz (Hooper eta McDonald, 2000). Kaltea ingurunera migratzeko moduagatik datorkio, ingurunean degradatzean oso toxiko diren polibromatuak askatzen baititu. Deka-209-aren desbromazioaren ondorioz toxikotasun handiagoa daukaten nona- eta okta-BDE ingurunera aska daitezke. Nona- eta okta-BDE hauek ez dira erraz degradatzen ingurunean, lurzoruetan eta sedimentuetan pilatuz hainbat urtez[6].

Orain arte aipatutakoa kontuan hartuta, lan honetan BFR baten azterketa sakona egin da. Zehazki, deka-209 sugar-atzeratzaileaz dopatuta dagoen akrilonitrilo butadieno estireno (ABS) matrize mikroplastikotik ur-ingurunera kutsatzaile organiko halogenatuen askapenaren monitorizazioa burutu da X Izpien Mikrofluoresentzia teknika (µ-XRF) erabiliz, gazitasunaren eta argi ultramorearen eragina aztertuz. Izan ere, deka-209 gaur egun asko erabiltzen den bromodun sugar-atzeratzailea da, etxeko altzarietan, tapizerian, gortinetan, etab. aurkitu ahal izan delarik (Resinex, 2022).

3. Ikerketaren muina

3.1 Laginak eta laginen tratamendua

Migrazio-esperimentuetarako ABS pilula komertzialak (Teknologisk Institut, Danimarka) eta Deka-209 %15-eko kontzentrazioan masan aberastutako ABS pilulak erabili dira. Kontzentrazio hori erabili da plastikoetan aurki daitekeen sugar-atzeratzaile kontzentrazioa delako. Pilulak zuriak dira, zilindro-formakoak, eta 2 eta 2,5 mm bitarteko neurriak dituzte (ikusi 1. Irudia). Erabilitako pilulen dimentsioak berdintzeko, eta XRF analisietarako aproposa den gainazal laua lortzeko, pilulak leundu eta 0,0167 ± 0,0001 g-ko batez besteko pisura berdindu dira leuntzeko makina automatiko (Forcipol®1, Metkon, Turkia) baten laguntzaz.

1. **Irudia: % 15 FR duen ABS laginaren irudia, aurrez aurre (ezkerrean) eta etzanda (eskuinean).**

Aurretik esan bezala, migrazio-esperimentuak ur ingurune batean egin dira, horretarako, eta gazitasun kontzentrazio ezberdinak lortzeko, itsasoko ur sintetikoa prestatu da Merck etxeko hurrengo erreaktiboak erabilita: sodio kloruroa (NaCl), sodio sulfatoa (Na_2SO_4), magnesio kloruroa ($MgCl_2$), kaltzio kloruroa ($CaCl_2$), potasio kloruroa (KCl), sodio bikarbonatoa ($NaHCO_3$), potasio bromuroa (KBr), boro trihidroxidoa ($B(OH)_3$), eta sodio fluoruroa (NaF). Gazitasunaren eragina aztertzeko, hiru gazitasun kontzentrazio desberdin prestatu dira, 35 g/L (gazitasun altua, GA, itsasoaren gazitasuna simulatuz), 17 g/L (gazitasun ertaina, GE, estuarioak

6 https://hmong.es/wiki/DecaBDE

simulatuz) eta 2 g/L (gazitasun baxua, GB, ibaiak simulatuz). Honetaz gain, UM erradiazioaren eragina aztertzeko UM kamera bat eraiki da, 23 W-ko *Tropic Pro Compact* UV-B bi bonbilla erabiliz. Itsasoko sistema natural bat simulatzeko asmoz, esperimentu guztietan 7,5 cm-ko adsorbatzaile bat erabili da (*silicon rod*), esperimentuetan zehar aztertutako plastikoek askatutako bromodun konposatua kontzentratzeko.

3.2 Metodo analitikoak

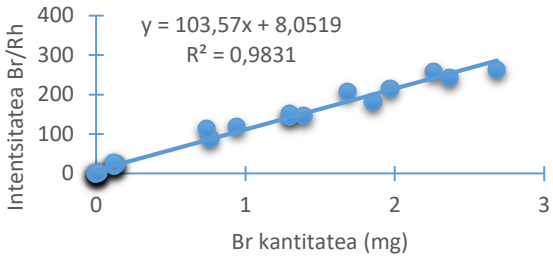
Migrazio esperimentuen aurretiko eta ondorengo laginen karakterizazioa egiteko *Dual* M4 TORNADO ED-XRF (Bruker Nano GmbH, Berlin, Alemania) espektrometroa erabili da. Ekipoak X izpien bi hodi ditu rodio-iturriarekin (Rh). Elementu arinen detekzioa hobetzeko (Z > 11) neurriak hutsean hartu dira (20 mbar), MV 10 N VARIO-B (Alemania) diafragma-ponpa bat erabiliz. Neurketen baldintzak ondokoak izan dira: azaleren analisia 25 µm-ko erresoluzio espazial daukan polikapilarrarekin egin dira, puntuen arteko distantzia 20 µm-koa izanik eta pixel bakoitzean 10-18 ms-ko neurketa eginez. Pilula bakoitzaren aurpegia birritan neurtu da errepikakortasuna bermatzeko, kasu guztietan lortutako desbiderapen estandar erlatiboa %1 baino baxuagoa izan delarik. XRF-a teknika elementala da, beraz ezin da deka-209 konposatua ikusi, soilik bertan dauden bromoen seinalea aztertu daiteke teknika honen bidez. Laginak karbonoz eta hidrogenoz osatuta daudenez, lagin gardenak dira XRF-an, perfektuak direlarik bertan dagoen Br kantitatea ikusteko. Gainera, esperimentuetan bromo iturri bakarra ABS-an dagoen deka-209a izango da, mikroplastikoak komertzialak izanik beste konposatu batzuen arrastorik ez dago. Adsorbatzailea ere ez baitu elementu horren presentziarik. X Izpien Mikrofluoreszentzia emandako informazioa osatzeko Raman espektroskopia erabili da (Renishaw Raman InVia, Erresuma Batua). Neurketak x20-ko objektiboarekin eta 785 nm-ko laser gorri batekin egin dira. Neurketak 100-3000 cm^{-1} tartean egin dira, laserraren potentzia % 10an finkaturik, eta neurketako 10 segundoko esposizio-denbora eta 2 metaketa aplikatuz.

3.3 Migrazioaren monitorizazioa

Deca-209-aren migrazioa monitorizatzeko lehenik eta behin Br kantitatea kuantifikatzea ahalbidetuko duen kalibratua eraiki da. Horretarako, sugar-atzeratzaile kontzentrazio desberdinak dituzten laginak daudela (% 0.1, % 1 eta % 15) aprobetxatuz, kalibratua eraiki da lagin bakoitzaren bromo kantitatea miligramotan adieraziz. Erabilitako laginak leundu egin dira aurpegi lau bat izateko, eta, gainera, tamaina egokitu ondoren, pisatu egin dira laginaren barruan dagoen bromo kantitatea zehazteko. Kontzentrazio ertaineko puntuak eraikitzeko, erdibitutako pilulak erabili dira. Horrela, kalibratuak 0 eta 2,5 mg Br tartea hartzen du, bost bromo kantitate maila ezberdin hartuz, maila bakoitzean 3 pilula erabili direlarik. Kanpo kalibrazioaren bidez lortutako zuzena $y = (103,6 \pm 2,9)\ x + (8,1 \pm 3,5)$ izan da, eta kuantifikazio- eta detekzio-mugak % 2 eta % 0,2, hurrenez hurren. 2. irudian, lortutako kalibratua adierazten da, eredu matematikoarekin eta horri dagokion determinazio koefizientearekin batera (R^2). Egunen arteko erreproduzibilitatea mantentzeko, seinale guztiak rodioaren intentsitatearen seinalearekin normalizatu dira.

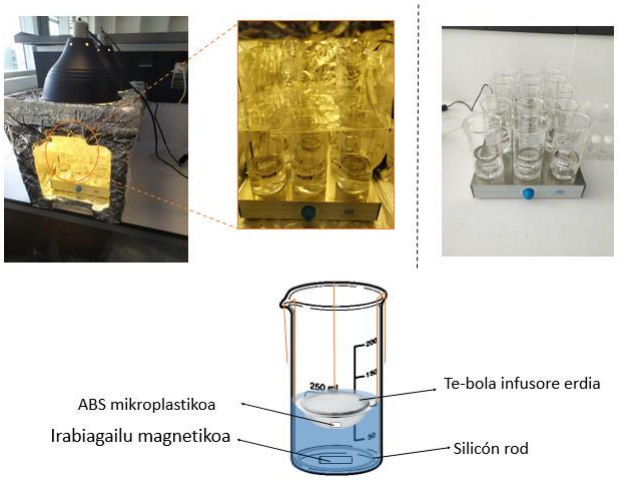
Bromoaren migrazioan gazitasunak eta argi ultramoreak duten eragina aztertzeko zenbait esperimentu prestatu dira. Hauek aurrera eramateko 15na postuko bi multi-irabiagailu erabili dira, horietako bat aurretik aipatutako UM kameraren barruan instalatuta eta bestea kanpoaldean. Hiru gazitasun-maila aztertu dira (GA, GE eta GB) eta argi ultramorearen kasuan 2 maila (23 h/eguneko argiarekin eta bestea argirik gabe).

2. Irudia: Kalibratuaren irudikapen grafikoa, Y ardatzean Br-en intentsitate normalizatua Rh-aren aurrean, eta X ardatzean pilula estandar bakoitzaren Br kantitatea mg-tan adierazita.



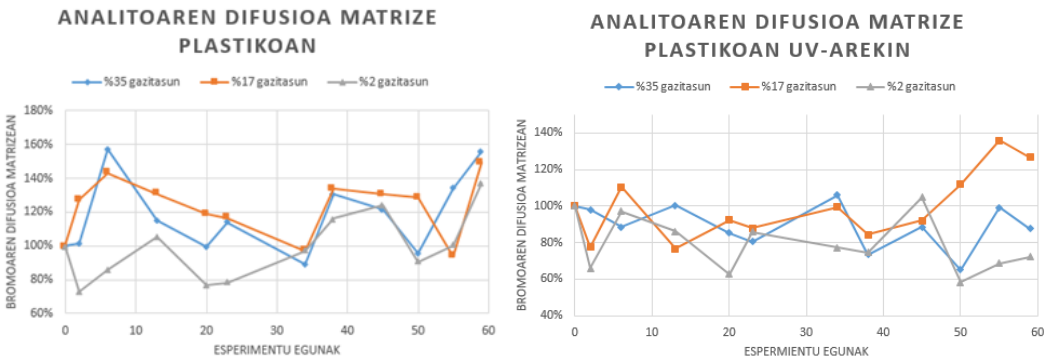
Analizatutako laginak denbora tarte desberdinetan (0 eta 59 egun bitartean) mantendu dira aipatutako baldintzetan. Analisietarako laginak atera eta analizatu ondoren (Br-aren edukia µ-XRF-aren bidez neurtuz), dagokien esperimentura itzuli dira monitorizazio jarraitua burutzeko. Esperimentu guztietan Plexiglass® xaflak erabili dira (ia gardenak UM erradiazioarekiko) estalki gisa prezipitatu ontzien goialdean jarrita, lurruntze-fenomenoek eragindako bolumen-aldaketa minimizatzeko. Aipatu beharra dago esperimentuetan ABS pilulak te-bola infusore baten barruan sartu direla Silicon Rod barrak ez kaltetzeko (ikusi 3. irudia).

3. Irudia: Esperimentuen diseinua, ezkerrean UM kameran eta eskuinean kanpoaldean (UM gabe)



Monitorizazio esperimentuetan lortu diren µ-XRF emaitzak grafikoki ikus daitezke 4. irudian.

4. Irudia: Bromoaren migrazio profilak plastikozko matrizean zehar, UM-arekin eta UM gabe. Profil urdina gazitasun altuko (GA) saiakuntzakoa da, laranja gazitasun ertaineko (GE) eta grisa gazitasun baxukoa (GB).



Datuek adierazten dutenez, aztertutako egunetan bromo kopuruak gora eta behera egin du, eta emaitza horrek ez du zentzurik. Are gehiago, askotan, pilulan neurtutako Br kantitatea zero denborako pilula berean neurtutakoa baino handiagoa da (>%100). Emaitza hauek ikusita XRFak ABSan polibromatuak neurtzeko arazoak modu kritikoan adierazten dituzten ikerketa-lan berriak kontsultatu dira (Alghamdi et al., 2022), eta berretsi da lanean diseinatutako neurketa-metodoa zuzena dela. Izan ere, ikerketa-lan horretan, neurketak modu egokian aurrera eramateko hurrengo baldintzak proposatzen zituzten: azaleraren analisia esposizio-denbora baxuarekin egitea, laginaren azalera leuntzea irregulartasuna konpontzeko, neurtu laginaren aurpegi berdina analisi bakoitzean, pilulak ondo garbitu edozein interferentzia ezabatzeko… eta lan honetan proposamen guzti horiek aurrera eraman dira. Hortaz, esperimentuetan lortutako emaitzak okerrak ez direla konfirmatu da eta Fick-en difusio legeak azal zezaketela ondorioztatu da. Ficken difusio legearen arabera konposatu bat eremu batetik beste baterantz mugituko da bi puntuen artean kontzentrazio (definizioz potentzial kimiko) diferentzia badago. Garraio hori, kontzentrazio gradientearen arabera gertatuko da, hau da, kontzentrazio altuko gunetik, kontzentrazio baxukora. Beraz, egunek aurrera egin ahala, hasiera batean plastikozko matrizean homogeneoki sakabanatutako FRa kanpoko geruzetara desplazatzen da. Horrela, Br seinalearen handipena XRFan azal daiteke FR partikulak gainazaletik oso gertu zeudenean egin direlako neurketak. ABS matrizea XRFrako gardena izan arren, bromoaren kokapena MPetan barrena egunekin gainazalera hurbiltzean X izpia energia gutxiago galtzen du analisian, analitoa detektatzeko zeharkatu behar duen lagin kantitatea txikiagoa baita.

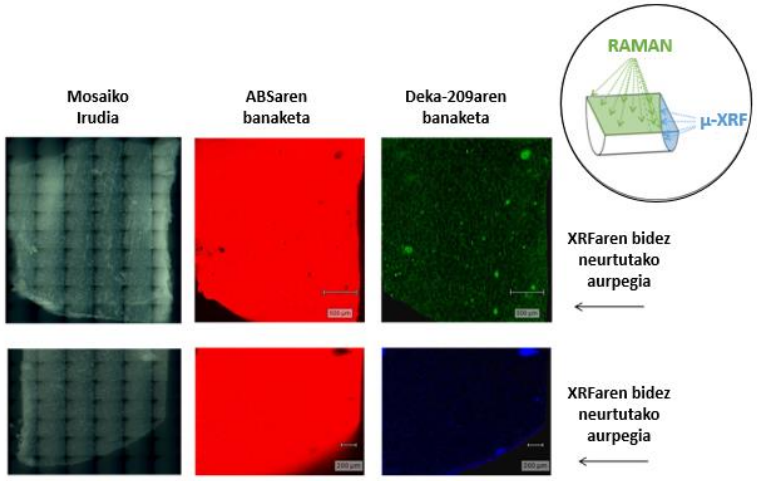
Izan ere, oro har, materialaren dentsitateak X izpiak bertan sartzeko ahalmenari ere eragiten diola badakigu. Horrela, teknikak hasieran baino bromo kantitate handiagoa jaso lezake. Hipotesi hori berresteko saiakuntzetako bi laginen ebaketa bertikalaren Raman irudi-analisiak egin dira, zehazki GB mailan eta UM argirik gabeko 0 eta 2. eguneko laginak analizatu ziren, ustez % 70eko hazkundea erakusten zutenak (ikusi 5. Irudia). Emaitzak ikusita, badakigu matrize plastikoan hasierako FRren banaketa homogeneoa dela, berdez kolorestatuta dagoen deka-209 matrize plastiko osoan zehar banatuta dagoelako. Era berean, ziurtatu da matrizean dagoen konposatua deka-209 dela, bertan agertzen diren bandak eta intentsitateak bat datozelako konposatu estandarrarekin. Esperimentuko bi egun pasa ondoren, Raman irudiak FRren aleen mugimendua erakusten du XRFak neurtzen duen azalerarantz, esperimentuen monitorizazioan lortutako kontzentrazioaren handipenaren arrazoia agerian utziz.

Hau ondorioztatuta gazitasunak eta UM argiak migrazioan duten eragina aztertu da.

Esperimentua GBn egiten denean (lerro grisa 4. irudian), lehenengo egunetan bromoaren seinalea jaitsi egiten dela ikusten da, eta, horrela, ingurunearen gazitasun baxuak sugar-atzeratzailea azalerarazten duela eta azkarrago askatzeko aukera ematen duela adierazten du. GEren datuek erakusten dute (lerro laranja 4. irudian) FRa azalerantz astiroago hedatzen dela denbora luzeagoa behar duelako.

Hala ere, GAren datuek erakusten dutenez (lerro urdina 4. irudian), analitoa MPen matrizean hedatzeko lehen faseak gutxienez bi egun behar ditu hasteko. Emaitza horiek bat datoz sistema plastiko-kutsatzaile organiko desberdinetan oinarrituta egindako lanetan (Pan et al., 2022), eta adierazten dute, halaber, gazitasun baxuak erraztu duela ABS motako MPetan dagoen Deka-209 ur-ingurunera askatzen. UM argia duten profilei erreparatuz gero (4. irudia), hiru gazitasun-mailetarako, profilaren hasiera bromo kopuruaren jaitsiera dakar, eta argi uzten du eguzki-esposizioaren ondorioz FRaren migrazioa azkarragoa dela. Hau, eguzki esposiziopean, tenperaturak gora egiten duela eta plastikoa osatzen duten polimeroaren kateek dardara egiten dutela adieraz dezake, FRaren askapena sinpleagoa eginez (Cheng et al., 2020). Horretaz gain, UM argiak MPn duen eragina bereiz daiteke saiakuntzetako pilulek kolore horixka hartzen dutelako UM esposiziorik gabekoekin alderatuta, ABSaren egituran duten eragina agerian utziz.

5. Irudia: ABSaren (gorria) eta Deka-209aren (berdea eta urdina) banaketaren Raman irudiak, ebaketa bertikala duten pilula-laginetan. Goiko aldean 0 egunean, eta beheko aldean 2.egunean baldintza berdinak erabiliz.



4. Ondorioak

Mikroplastiek duten kutsatzaileen determinazioa egitea mundu mailan erronka analitikoa dela argi dago, are gehiago mikroplastikoetan adsorbatuta dauden kutsatzaileen ikerketa, hauen kontzentrazio-maila baxuak direla eta. Azken honetan oinarrituta lan honetan, gehigarri bezala ABS matrize mikroplastikoan dagoen deka-209 sugar-atzeratzailearen askapen prozesua aztertu da ingurune urtsu naturalak simulatuz. X Izpien Mikrofluoreszentziak akrilonitrilo butadieno estireno (ABS) matrize mikroplastikotik ur-ingurunera deka-209 sugar-atzeratzailearen askapena monitorizatzeko tresna gisa erabili da. XRF eta Raman tekniken konbinaketa migrazio prozesuak aztertzeko metodologia erabilgarria dela azpimarra daiteke. Bestetik, ur-sistema naturala modu egokian simulatzea lortu da, izan ere, GBn saiakerako bi kasuetan (argiarekin eta argirik gabe), bigarren eguneko bromo seinalea, hasierako baino seinale txikiagoa dela ikusita, esan daiteke benetako ibai edo lakuetan ikusi izan diren ondorio berdinetara iristea posiblea izan dela, hots, gazitasun baxuko inguruek ABS matrizetik gehigarri mota hori askatzen laguntzen dutela. Modu berean, eguzkiko UM argia halogenatuen askapenean duten garrantzia frogatu da.

5. Etorkizunerako planteatzen den norabidea

Lan hau amaitutzat jotzeko, ur-ingurunera askatutako FRaren kuantifikazioa egitea falta da. Horretarako saiakuntzetan erabilitako Silicon Rod-en edukiaren desortzioa burutzeko asmoa dugu, Deka-209aren konposatu desbromatuak identifikatzeko eta kuantifikatzeko, gas kromatografia-masa espektrometriaz (GC-MS) baliatuta.

6. Erreferentziak

Alghamdi, M., Abdallah, M. A. E., & Harrad, S. (2022). The utility of X-Ray fluorescence spectrometry as a tool for monitoring compliance with limits on concentrations of halogenated flame retardants in waste polymers: A critical review. *Emerging Contaminants*, *8*, 9-20. https://doi.org/10.1016/j.emcon.2021.12.002

Bergmann, M., Gutow, L., & Klages, M. (2015). *Marine anthropogenic litter*. Springer Nature.

Cheng, H., Luo, H., Hu, Y., & Tao, S. (2020). Release kinetics as a key linkage between the occurrence of flame retardants in microplastics and their risk to the environment and ecosystem: A critical review. *Water Research*, *185*, 116253. https://doi.org/10.1016/j.watres.2020.116253

European Food Safety Authority. *Brominated flame retardants*. Berreskuratuta 2022-ko apirilak 20 https://www.efsa.europa.eu/en/topics/topic/brominated-flame-retardants

He, W., Song, P., Yu, B., Fang, Z., & Wang, H. (2020). Flame retardant polymeric nanocomposites through the combination of nanomaterials and conventional flame retardants. *Progress in Materials Science*, *114*, 100687. https://doi.org/10.1016/j.pmatsci.2020.100687

Hooper, K., & McDonald, T. A. (2000). The PBDEs: an emerging environmental challenge and another reason for breast-milk monitoring programs. *Environmental health perspectives*, *108*(5), 387-392. https://doi.org/10.1289/ehp.00108387

Jovanović, B. (2017). Ingestion of microplastics by fish and its potential consequences from a physical perspective. *Integrated environmental assessment and management*, *13*(3), 510-515. https://doi.org/10.1002/ieam.1913

Luo, H., Liu, C., He, D., Xu, J., Sun, J., Li, J., & Pan, X. (2022). Environmental behaviors of microplastics in aquatic systems: A systematic review on degradation, adsorption, toxicity and biofilm under aging conditions. *Journal of Hazardous Materials*, *423*, 126915. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.126915

Morgan, A. B., & Gilman, J. W. (2013). An overview of flame retardancy of polymeric materials: application, technology, and future directions. *Fire and Materials*, *37*(4), 259-279. https://doi.org/10.1002/fam.2128

Owen, S. R., & Harper, J. F. (1999). Mechanical, microscopical and fire retardant studies of ABS polymers. *Polymer Degradation and Stability*, *64*(3), 449-455. https://doi.org/10.1016/S0141-3910(98)00150-5

Pan, Y. F., Liu, S., Lin, L., Cheng, Y. Y., Hou, R., Li, H. X., Yuan, Z., & Xu, X. R. (2022). Release behaviors of hexabromo cyclododecanes from expanded polystyrene microplastics in seawater and digestive fluids. *Gondwana Research*, *108*, 133-143. https://doi.org/10.1016/j.gr.2021.10.030

Posner, S. (2009). Guidance on alternative flame retardants to the use of commercial pentabromodiphenylether (c-PentaBDE). *Norwegian Pollution control Authority (SFT) on behalf of UNEP, United Nations*, Oslo.

Resinex, *ABS | Tipos de polímeros - Resinex*. Berreskuratuta 2022-ko otsailaren 14an https://www.resinex.es/tipos-de-polimeros/abs.html

Shen, J., Liang, J., Lin, X., Lin, H., Yu, J., & Wang, S. (2021). The Flame-Retardant Mechanisms and Preparation of Polymer Composites and Their Potential Application in Construction Engineering. *Polymers*, *14*(1), 82. https://doi.org/10.3390/polym14010082

Visual Feature | Beat Plastic Pollution. (2022, martxoak 1). UN Environment Programme. Berreskuratuta 2022-ko apirilaren 14an, https://www.unep.org/interactives/beat-plastic-pollution/

Xiaonan, L., Wenmin, F., Liangzhu, X., (2017). Study on flame retardant ABS. *Materials Science: Materials Review*, 1(1), 1-10 http://doi.org/10.18063/msmr.v1i1.506

Zhang, S., Wang, J., Liu, X., Qu, F., Wang, X., Wang, X., Li, Y., & Sun, Y. (2019). Microplastics in the environment: A review of analytical methods, distribution, and biological effects. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, *111*, 62-72. https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.12.002

7. Eskerrak eta oharrak

Espainiako Gobernuko Zientzia eta Berrikuntza Ministerioak finantzatutako "*Multi-scale approach for identifying (micro) plastics and understanding their transport, distribution, impact and interaction with trace elements in real environmental compartments*" (PLASTeMER) (Erref. PID2020-118685RB-I00) proiektuari. Eusko Jaurlaritzak finantzaturiko "*IBeA, Ikerketa eta Berrikuntza Analitikoa ikertalde kontsolidatua (2022-2024, Erref. IT-1446-22)*" izeneko proiektuaren babesean egin da lan hau. Eskerrak Jose Manuel Amigori esperimentazioan erabilitako plastikoak emateagatik. E. Fraga ikerlariak eskerrak eman nahi die IBeA Ikerketa Taldeko kide guztiei, lan honetan zehar emandako laguntzagatik.

Mikroplastikoen karakterizazio kimikoa eta morfologikoa: Sopelako Atxabiribil hondartzako kasua

Aritz Lapazaran[1], Uxue Uribe[1], Thomas Maupas[1], Olivia Gomez-Laserna, Leire Mijangos[1,2], Alberto de Diego[1,2],

(1) Zientzia eta Teknologia Fakultateko Kimika Analitikoa saila, Leioa, Euskal Herriko Unibertsitatea

(2) Plentziako Itsas Estazioa (PIE), Plentzia, Euskal Herriko Unibertsitatea
alapazaran002@ikasle.ehu.eus

Laburpena

Mikroplastikoen presentzia handitzen ari da munduko ozeano guztietan eta biotan, itsasoko uretan, sedimentuetan eta kostaldeetan meta daitezke. Mundu mailako arazo bihurtzen ari den auzi honek euskal kostaldean duen egoera ikertzeke dago oraindik. Sopelako Atxabiribil hondartza abiapuntutzat hartuta eta auzi honetan hastapeneko urratsak emateko, hondartza horretan dauden mikroplastikoak hartu eta morfologikoki eta kimikoki karakterizatu dira. Aztertutako ezaugarriak forma, kolorea eta egitura kimikoa izan dira eta beraien arteko erlazioak zeintzuk diren ikertu da. Bildutako mikroplastiko gehienak bolatxo formadun polietilenozko ale zuriak dira.

Hitz gakoak: mikroplastikoak, karakterizazio morfologiko eta kimikoa, Raman espektroskopia, Infragorri espektroskopia

Abstract

The presence of microplastics is increasing in all the world's oceans and can accumulate in biota, marine waters, sediments and coasts. The magnitude of this problem, which is becoming a global issue, is yet to be investigated on the Basque coast. Taking the beach of Atxabiribil in Sopelana as an example and in order to start making progress in this issue, microplastics have been collected by hand and further characterized morphologically and chemically. We measured the shape, colour and chemical structure of the collected items and the relationships among were investigated. Most of the microplastics were white pellets of polyethylene.

Keywords: microplastics, morphological and chemical characterization, Raman spectroscopy, Infrared spectroscopy

1. Sarrera eta motibazioa

Urtero, hondakin ugari iristen da gure ozeanoetara, eta mendeetan iraun dezake han. Objektu baliogabeak, plastikoak eta gizakiak egindako beste objektu batzuk lurreko eta itsasoko jardueretatik datoz. Itsasoko eta itsasertzeko inguruneari gero eta gehiago eragiten dio itsasoko zaborrak: gure hondartzetan, itsaso zabalean eta itsasoaren hondoan aurkitzen da, eta itsas faunarentzako mehatxu handia da (Landrigan et al., 2020). Zabor plastikoa, beste hondakinekin alderatuta, iraunkorragoa da ozeanoetan, plastikoen ezaugarri fisiko-kimikoen ondorioz. 260.000 tonatik gora plastiko ozeanoetan flotatzen ari dira, hondakinak desegoki ezabatzearen ondorioz (Eriksen et al., 2014). Gaur egun, kutsadura plastikoa kezka larria bihurtu da ozeanoko ia leku guztietan, munduko eskualde garatuak edo azpigaratuak edozein direla ere.

Hondakin plastikoak ur-ekosistematan metatzen dira, zuzenean edo zeharka, iturri mota desberdinetatik. Lurreko eta ozeanoetako iturriak kutsadura plastikoaren iturri kritikoak dira kostaldeko eta itsasoko ekosistemetan. Lurrean oinarritutako kutsadura plastikoaren iturri nagusiak ur gezaren sarrera, etxebizitzetako eta etxeetako jarduerak, turismoa eta bestelako ekintza ekonomikoak dira, portuko eragiketak barne. Itsasoko zabor plastikoko gaien %75 baino gehiago lurreko iturrietatik pilatzen da. Halaber, hondakin plastikoak ur gezako ekosistema naturaletan metatzen dira, hala nola ibaietan eta erreketan, edo lur azpiko uretan lixibiatzen dira eta, azkenik, ozeanoan amaitzen dute. Itsas korronteen ondorioz, plastiko hauek kostaldean metatzen dira. Itsas zabaleko jarduerak, hala nola arrantza komertziala, nabigazio-ekintzak, hondakinak isurtzea eta itsaskien eta arrainen kultura, ozeanoan oinarritutako zabor iturri giltzarriak dira, eta itsasoko eta kostaldeko eremuetan hondakin plastikoak pilatzen laguntzen

dute. Itsas zabaleko arrantzarekin eta akuikulturarekin lotutako eragiketak kutsadura plastikoaren iturri garrantzitsu gisa identifikatu dira ozeanoetan eta kostaldeko ekosistemetan (Andrady, 2011).

Plastikoak sintekikoki edo erdi-sintetikoki sortutako materialak dira, polimero batez eta nahi diren propietateak lortzeko gehitzen zaizkien konposatuz osatutakoak (pigmentuak, antioxidatzaileak, etab.). Polimeroak monomeroz osatuta daude eta, hauek, elkarri lotzen zaizkien polimeroaren zati txikienak dira. Adibidez, errepikatzen den zatia etileno molekula bada, lortuko den polimeroa polietilenoa izango da. Beraz, monomero mota bakoitzaren araberakoa izango da lortuko den polimeroa (polipropilenoa (PP), poliestirenoa (PS), etab.). Plastikoak kimikoki sailkatzeaz gain, tamainaren arabera ere sailkatu ohi dira: megaplastikoa (>1 m), makroplastikoa (<1 m), mesoplastikoa (<2,5 cm), mikroplastikoa (<5 mm), nanoplastikoa (<100 nm) (Wang et al., 2018). Plastikozko zatirik handienak, batzuetan, zuzenean askatzen dira hondakin megaplasiko edota makroplastiko gisa, eta mikroplastiko bihurtzen dira ingurumenean. Makroplastikoak erraz degradatu daitezke mikro eta nano tamainako plastikoetan, eta degradazioa (plastikoaren egoera aldatzea), fotodegradazioa, degradazio mekanikoa eta hidrolisia bezalako prozesuak jasaten dituzte. Plastikoen biodegradagarritasuna ere funtsezkoa da haien xedea ulertzeko (Hartmann et al., 2019). Mikroplastikoak bi eratakoak izan daitezke: lehen mailako mikroplastikoak eta bigarren mailako mikroplastikoak. Mikroplastiko primarioak mikro tamainako plastikoak dira, eta helburu jakin baterako edo produktu baterako erabiltzen dira. Mikroplastiko primarioak kosmetikoak (hortzetako pasta, dutxako gela, etab.) eta botikak egiteko erabiltzen dira batez ere. Bigarren mailako mikroplastikoak makroplastikoak lurrean eta itsasoan degradatzearen ondoriozko hondakin plastikoak dira. Ingurune irekian, zati makroplastikoak prozesu kimiko, biologiko, fisiko eta mekanikoen eraginpean jartzen dira, eta plastikoen ohiko propietateak aldatzen dituzte, hala nola egitura eta osotasuna. Ondorioz, plastiko handiak degradatu egiten dira plastiko-zati oso txikitan (Andrady, 2011).

Mikroplastikoen eragin ekotoxikologikoa kontutan hartzekoa da; izan ere, mikroplastikoen tamaina elikatze-materiaren tamainaren antzekoa da, hala nola planktona eta esekitako partikulak (Wright et al., 2013). Ezaugarri horri esker, ornogabeek mikropartikula horiek irentsi ditzakete eta ondorio kaltegarriak izaten dituzte, hala nola, hantura-arazoak ornogabeetan (Von Moos et al., 2012). Halaber, antibiotikoek, konposatu organikoek eta ioi metalikoek elkarrekintzak izaten dituzte mikroplastikoekin eta adsortzio bitartez elkartzen dira. Ondorioz, zenbait kutsatzaile garraiatzeko ahalmena dute, biotan metatzeko aukera handituz. Kutsatzaile horien artean daude honako hauek: bisfenol-A (BPA), monomeroak, sugar-atzeratzaileak, oligomeroak, ioi metalikoak eta antibiotikoak (sulfametoxazola, adibidez). Mikroplastikoen eta hauek garraiatzen dituzten kutsatzaileen eragina haratago joan daiteke. Izan ere, konposatu kimiko toxikoak maila trofiko altuagoetan meta daitezke, plastikoz, material iraunkorrez, metal astunez eta konposatu farmazeutikoez kutsatutako izakiak irentsiz gero. Ondorioz, substantzia kimiko horiek elikagaien sareen bidez sar daitezke gizakietara (Cole et al., 2011).

Mikroplastikoen presentzia handitzen ari da munduko ozeano guztietan eta biotan, itsasoko uretan, sedimentuetan eta kostaldeetan meta daitezke. Mikroplastiko arinek eta dentsitate txikikoek uretan flotatzen dute, eta dentsitate handiko partikula plastikoak sakoneko sedimentuetan pilatzen dira (Thompson et al., 2009). Hori dela eta, garrantzi handikoa da ingurune horietan pilatutako mikroplastikoen karakterizazioa eta kuantifikazioa egitea, arazoaren izaria aztertzeko. Horretarako, laginen bilketa, laginen tratamendua eta analisia egin behar da. Lehen bi urratsak aukeratutako ingurunearen arabera (hondartzak, itsasoa, estuarioak, etab.) desberdinak dira. Hondartzen kasuan, azken urteetan lagina biltzeko prozedurak proposatu dira, hala nola, MSFDk (*Marine Litter of the European Commission's Marine Strategy Framework Directive* (MSFD, 2013)) eta NOAAk (*National Oceanic and Atmospheric Administration*) (Masura et al., 2015) proposatutakoak. Laginen tratamenduan badira urrats beharrezko ohiko batzuk: mikroplastikoen erauzketa (baheketa bidez, dentsitate bidez,…) eta materia organikoaren deuseztatzea (ur oxigenatua erabiliz, digestio alkalino bidez, digestio azido bidez,…). Analisiari dagokionez, mikroplastikoak oso aktiboak dira infragorri eta Raman espektroskopian, beraien izaera kimikoa dela eta. Bibrazio-espektroskopiaren bi metodoak ez suntsikorrak, oso zehatzak

eta osagarriak dira, eta argiaren eta molekulen arteko elkarrekintzan oinarritutako espektroa sortzen dute: infragorrizko espektroskopiak momentu dipolarrean gertatutako aldaketaren ondoriozko espektroa sortzen du; Ramanek, berriz, lotura kimikoen polarizazioan oinarritutako aztarna molekularraren espektroa ematen du (Elert, 2017).

2. Arloko egoera eta ikerketaren helburuak

Mikroplastikoen inguruko ikerketek gora egin dute azken urteetan, hauek ingurumenean eragindako kaltearen larritasunaren ondorioz. Horretarako, besteak beste, hondartzetan dauden mikroplastikoen presentzia, forma eta izaera kimikoa urtean zehar monitorizatzeak oso informazio baliotsua eman dezake. Bizkaiko Golkoan badira monitorizatzen diren hondartza batzuk, izan ere, zenbait autorek Bizkaiko Golkoa itsas hondakinak metatzeko eremu gisa identifikatu dute (Galgani et al., 1995). 2016. urtetik CEDEXek (*Centre for Public Work Studies and Experimentation, Spanish Ministry of Development*) Bizkaiko Golkoko bi hondartza monitorizatzen ditu: Covas (Galizia) eta Oyambre (Kantabria) (Mendoza et al., 2020). Laginketa-kanpainak udaberrian eta udazkenean egiten dira, urtarokotasunak eragindako desberdintasunik ote dagoen aztertzeko. Covas hondartzan egindako mikroplastikoen monitorizazioan lortutako mikroplastikoen kontzentrazioa 4,1-23,0 ale/kg hondar lehor artekoa izan da eta Oyambre hondartzan 1,0-18,0 ale/kg hondar lehor artekoa. PP (%38) eta PE (%24) izan ziren polimero arruntenak, batez ere harizpiak eta zatiak (%84). Ez zen bolatxo formako (*pellet* ingelesez) mikroplastikorik ikusi, eta horrek iradoki zuen jatorri sekundarioko mikroplastikoak zeudela batez ere. Bilatu zituzten mikroplastikoen koloreak nagusiki zuria, grisa eta urdina izan ziren. Hartutako lagin ia guztietan aurkitu ziren mikroplastikoak (%60-%100 artean), hondartzetan beraien presentzia nabarmena dela erakutsiz. Horrez gain, Frantziako Pays de la Loire eskualdeko hiru hondartzatan (Bizkaiko Golkoko iparraldean) ere egin da mikroplastikoen inguruko ikerketa marea arteko sedimentuetan (Phuong et al., 2018): PenBé, Coupelasse eta Aiguillon Bay hondartzetan. Hauen kasuan, kontzentrazioa zerbait altuagoa izan da (67 ale/kg) baina emaitzak aldakorrak izan dira tokiaren eta urtarokotasunaren arabera. Bizkaiko golkoan zehar kostako gainazaleko uretan dauden mikroplastikoei buruzko ikerketak gero eta gehiago dauden arren, hondartzetako egoera aztertzen duten ikerketa gutxi daude, eta guk dakigunez, oraindik ez da horrelakorik egin Euskal Herriko inongo hondartzatan.

Hau guztia kontutan hartuz, Sopelako Atxabiribil hondartzako hondarretan eskuz bildutako mikroplastikoen karakterizazio morfologikoa eta kimikoa burutzea izan da ikerketa honen helburua. Lortuko den informazioa oinarrizkoa izango baita gerora ikerketa sakonago batzuk bideratu ahal izateko.

3. Ikerketaren muina

3.1 Ikerketa-gunea eta laginketa

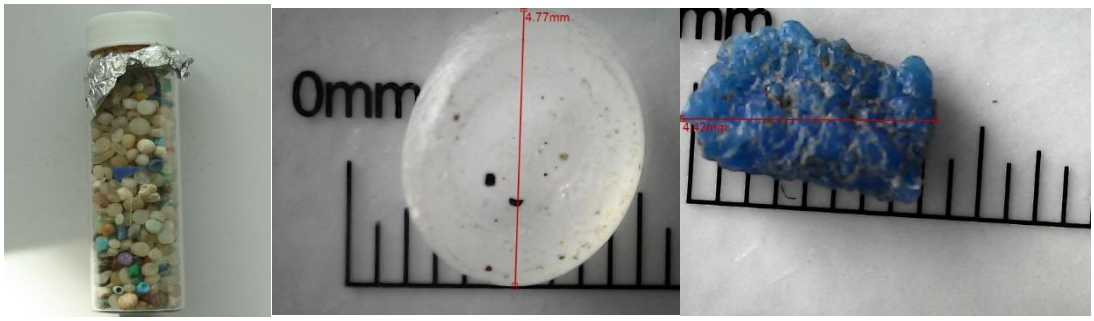
Sopelako Atxabiribil hondartza hautatu da bertako mikroplastikoen karakterizazio morfologikoa eta kimikoa egiteko; izan ere, etorkizuneko lan batean urte osoan zehar gizakiak dabiltzan hondartza baten (Atxabiribil hondartza) eta isolatutako hondartza baten (Kantabriako Sonabia hondartza) arteko konparazioa egingo da, mikroplastikoen kutsadurari dagokionez. Hondartza herrigunetik 2,5 kilometrora dago, Plentziatik 6 kilometrora eta Bilboko itsasadarraren bokaletik 8 kilometrora. Bilboko portua, hots, Bilbotik Zierbenaraino luzatzen den portua, 10 kilometrora dago eta Getxoko kirol-portua, berriz, 8 kilometrora. Hondartza 826 metro luze eta 25 metro zabal da itsasgoran (160 metro itsasbeheran), malda nahiko handiarekin hondartzaren hasieran. Ingurua erdi urbanizatuta dago eta autoz heldu daiteke, hondartzaren sarreretan autoentzako aparkaleku handiak baitaude. Interes geologiko handiko itsaslabarren artean dago, ondoan beste hondartza batzuekin batera. Okupazio-maila oso altua izaten da udan, baina baita beste urtaroetan ere (nahiz eta hain altua izan ez). Zerbitzu ugari daude: komunak, dutxak, taberna, hondartza garbitzeko lanak, surf ikastaroak, sorosle zerbitzua, zakarrontziak, aldagelak, etab. Jarduera ohikoenak surfa, arrantza eta aisialdia dira. Astelehenetik larunbatera egunero

garbitzen dute Bizkaiko Aldundiko langileek. Esposizio altuko hondartza baten adibide bezala har daiteke.

1. irudia. Atxabiribil hondartzaren kokapena eta bere satelite bidezko irudia.

Laginketa egiteko aurrez aipatutako zenbait prozedura estandar edo bateratu ezartzeko ahaleginak egin diren arren, ikerketa honen xederako ez da beharrezkoa izan halako prozedura jarraitzea. Izan ere, ikerketa honetan ez da mikroplastikoen kuantifikazio zehatza egin nahi izan. Asmoa, hondartzetan pilatzen diren mikroplastikoak nolakoak diren aztertzea izan da, bai morfologikoki bai kimikoki. Beraz, horretarako nahikoa izan da zenbait pertsonen artean mikroplastikoak eskuz biltzea. Baina, bilketa hori ez da hondartza osoan zehar itsu itsuan egin, zenbait gauza kontuan hartu dira. Mikroplastikoen banaketa, neurri handi batean, haien propietateek eta ingurumen-faktoreek eragiten dute, hala nola haizeek, mareek eta korronteek. Ondorioz, laginketa itsasgora izan ostean egin da, itsasgorak utzitako lerroari jarraituta, ohikoa izaten baita mikroplastikoak bertan pilatzea. Atxabiribil hondartzako laginketa 2022ko azaroaren 3an egin zen, 16:00-18:00 bitartean, lau ikertzailerekin, itsasgora 12:32 izan zelarik. Guztira 402 mikroplastiko ale batu ziren. Denak analizatu ziren, bakoitzaren masa ere neurtu zelarik.

2. irudia. Atxabiribil hondartzan 2022ko azaroaren 3an bildutako mikroplastikoak: denak batera (ezkerrean), bolatxo formaduna (erdian) eta zatia (eskuman).

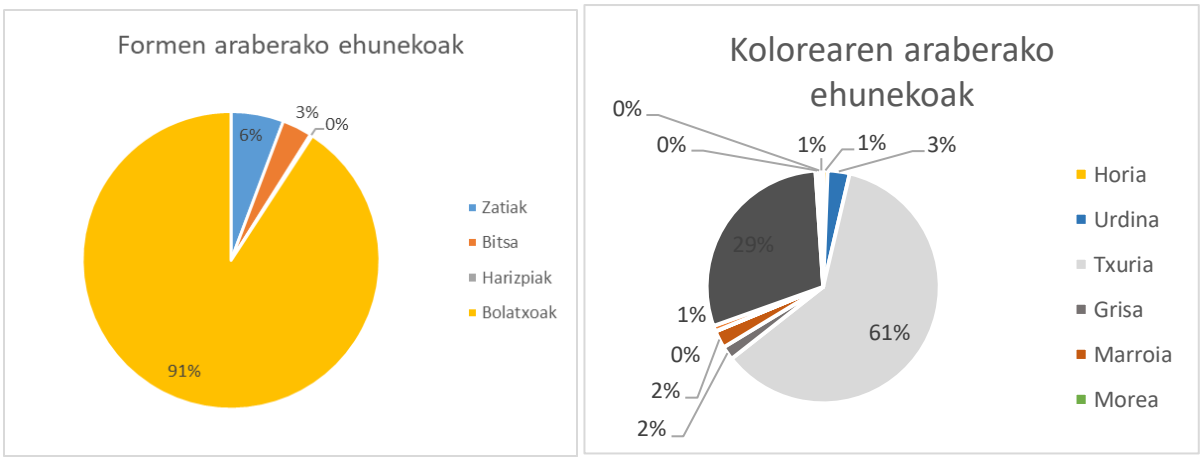


3.2 Karakterizazio morfologikoa

Karakterizazio morfologikoan mikroplastikoen bi ezaugarri nagusi aztertu dira begi bistaz: kolorea eta forma. Talde bakoitzaren masa erlatiboaren arabera kalkulatu ziren portzentajeak. Koloreak informazio interesgarria eman dezake plastikoak duen konposizioari dagokionez, espezifikoki, bere ekoizpenean erabilitako gehigarriei buruz. Mikroplastiko gehienak zuriak izan dira (masa osoaren %61) baina beltzak ere nabarmen daudela ikusi da (%29). Beste koloretakoak (urdina, marroia eta grisa, besteak bete), aldiz, ez dira ohikoak izan (ikusi 3. irudia). Formak

informazio ugari eman dezake beraien sortzeko ituari buruz; hots, primarioak edo sekundarioak diren jakiteko baliagarria da, besteak beste. Forma ezberdinak daude: bolatxoak (ingelesezko pellet ospetsuak), bitsak, zatiak, harizpiak, filmak, etab. Forma ugariena, oso nabarmen, bolatxoa izan da (masa osoaren %91), eta modu apalagoan zatiak (%6) eta bitsak (%3) agertu dira (ikusi 3. irudia).

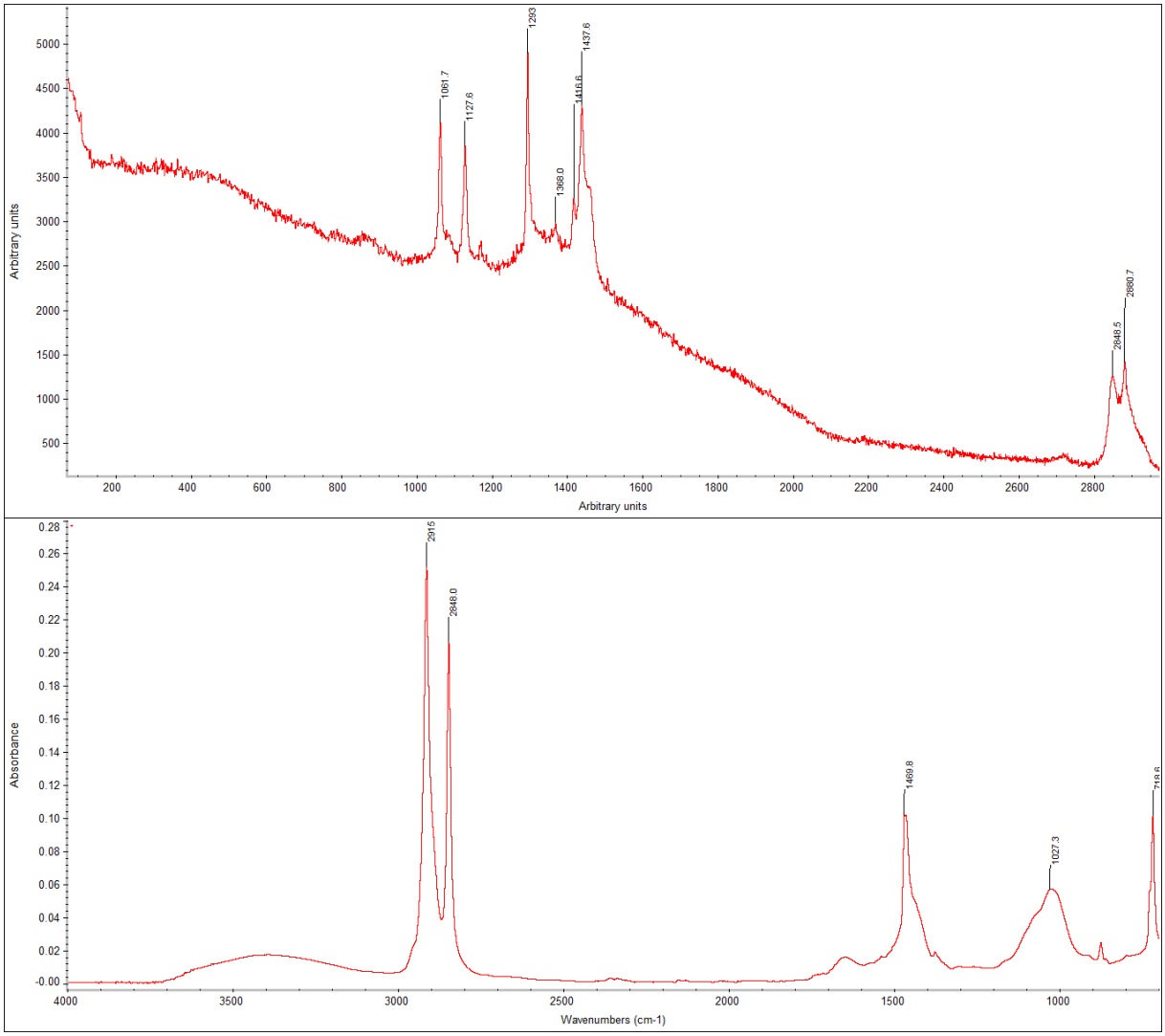
3. irudia. Analizatutako mikroplastikoen banaketa formaren eta kolorearen arabera. Mikroplastikoen masa osoarekiko portzentaje bezala adierazten dira banaketak.



3.2 Karakterizazio kimikoa

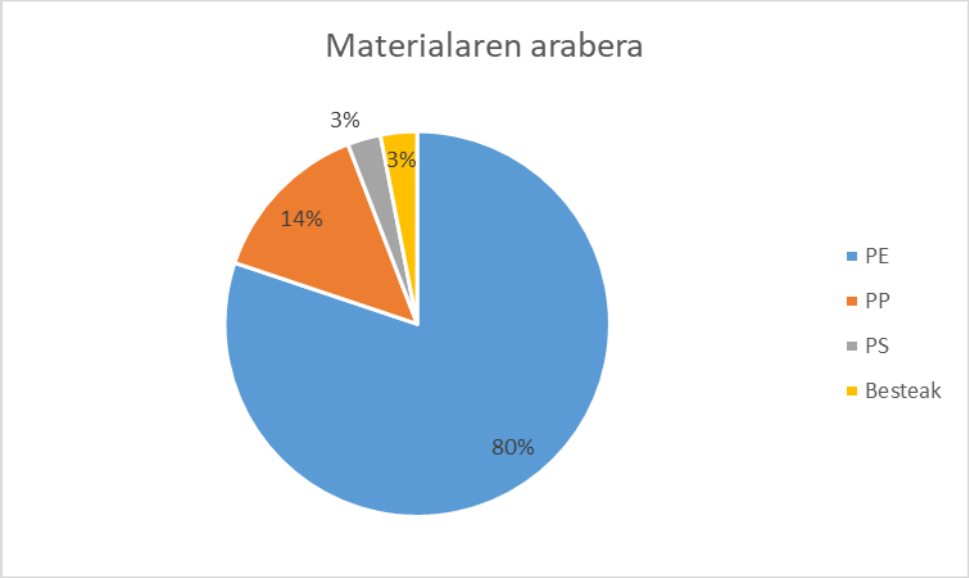
Mikroplastikoen beste ezaugarri garrantzitsu bat beraien izaera kimikoa da; hots, beraien egitura kimikoa. Izan ere, informazio honek mikroplastikoak nondik datozen eta beraien elkarrekintzak beste kutsatzaileekin arakatzeko balio dezake. Karakterizazio kimikoa bibrazio-espektroskopia bitartez egin da: infragorri espektroskopia eta Raman espektroskopia bidez. Bi teknikak ez-suntsikorrak izateaz gain, analisi denbora nahiko laburra dute eta aise identifikatzen dira lortutako espektroak. Oro har, Raman erabili da (Microbeam markako BWTEK raman eramangarria) analisi-denbora laburragoa duelako (785 nm-ko uhin luzera duen laser gorria, 5 scan, 5 segundo eta %60ko potentziarekin), baina, mikroplastiko batzuen kasuan Ramanekin identifikatzea ez da posible izan eta infragorria erabili behar izan da (100 scan, 4.0 cm^{-1}-eko erresoluzioarekin eta 4000 cm^{-1} eta 700 cm^{-1} artean), JASCO markako FT/IR-6300 espektroskopioa. Mikroplastiko beltzen kasua izan da hori, eta baita berde eta urdin koloreko batzuen kasua ere. Izan ere, Raman espektroskopian laserra erabiltzen da eta honek kolore horietako mikroplastikoak erretzen ditu. Adibide moduan, 4. irudian analizatutako mikroplastiko bati dagozkion IR eta Raman espektroak ikus daitezke, identifikazioan erabilitako bandak markatuta.

4. irudia. 2.irudian agertzen den erdiko mikroplastikoaren raman (goikoa) eta infragorri (behekoa) espektroak, polietilenoari dagozkionak.



Plastikoak polimero desberdinak izan daitezke: polietilenoa (PE), polipropilenoa (PP), polibinil kloruroa (PVC), poliestirenoa (PS), poliesterrak (PES), poliamidak (PA), polietilen tereftalatoa (PET), polikarbonatoa (PC), etab. Horietako batzuk itsasoko urak baino dentsitate altuagoa dutenez, eta hondartzetan mikroplastikoak itsasotik modu nabarmenean sartzen direla kontuan hartuz, ez dira agertu (hala nola, PC eta PET). Polietilenozko mikroplastikoak izan dira gehien agertu direnak alde nabarmenarekin (masa osoaren %80) eta askoz modu apalagoan baina besteak baino gehiago polipropilenozkoak izan dira (%14). Poliestirenozkoak ere agertu dira (%3) eta espektroa identifikatzea ezinezkoa izan den kasuetan “besteak” bezala sailkatu dira (ikusi 5. irudia).

5. irudia. Analizatutako mikroplastikoen banaketa egitura kimikoaren arabera. Mikroplastikoen masa osoarekiko portzentaje bezala adierazten dira banaketak



Aipatzekoa da egitura kimikoaren, formaren eta koloreen artean erlazioak daudela. Horren adibide garbiena da bits forma duten mikroplastiko guztiak poliestirenozkoak direla eta ia denak zuriak direla. Kontrara, bolatxo formako bakar bat ere ez da poliestirenozkoa izan. Halaber, zuriak edo beltzak ez diren mikroplastikoen ehunekoa handiagoa da zati edo pusketa forma dutenen kasuan.

4. Ondorioak

Mikroplastikoak gure kostaldean duten presentzia agerikoa izan da hain denbora tarte laburrean bildutako kopuruagatik, nahiz eta hondartzan garbiketa zerbitzuak egon. Mikroplastiko horiek gehien gehienean hiru ezaugarri dituzte komunean, Bizkaiko Golkoan egindako ikerketekin bat ez datozenak, kolorea izan ezik (zentzu horretan lagindutako hondartzaren inguruan dauden giza aktibitateek eragina izan dezakete). Batetik, bolatxo formakoak dira; beraz, mikroplastiko primarioak dira, beste plastiko batzuk sortzeko lehengai gisa ekoizten direlako. Bigarrenik, kolore zurikoak dira, eta, hirugarrenik, beraien egitura kimikoa polietilenoarena da. Ezaugarri adierazgarrienak horiek diren arren, beste ezaugarri batzuk dituzten mikroplastikoak ere agertu dira, eta hauek kontuan hartzea komeni da auzi honi errotik heltzeko. Bestalde, hondartzetan soilik PE, PP eta PS agertzeak, beste egitura kimiko bat dutenak itsas hondoan metatu direla adierazten du, seguru asko. Beraz, Atxabiribil hondartzan dauden mikroplastikoen ezaugarri fisiko zein kimikoak nolakoak diren aztertzea lortu da.

5. Etorkizunerako planteatzen den norabidea

Euskal kostaldean mikroplastikoen auzia aski ikertu gabe dago eta arazoaren nondik norakoak ikertzeko abiapuntutzat har daiteke ikerketa hau. Beharrezkoa da, euskal kostaldeko hondartzen monitorizazioa egitea urtean zehar, ikusteko zenbat mikroplastiko metatzen diren. Ez bakarrik hondartzetan, baita itsas hondoan, itsasoko uretan eta biotan ere, eta aztertu egin beharko litzateke horrek nolako eragina sortzen duen ekosistemetan eta gizakiongan, kutsatzaile kimiko ugari garraiatzeko gai baitira. Modu honetan arazo honen larritasuna norainokoa den ulertuko da eta, noski, honek arazoari aurre egiteko balio beharko du.

6. Erreferentziak

Andrady, A.L., 2011. Microplastics in the marine environment. *Mar. Pollut. Bull.* 62, 1596–1605. https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0025326X11003055.

Cole, M., Lindeque, P., Halsband, C., Galloway, T.S. (2011). Microplastics as contaminants in the marine environment: a review. *Mar. Pollut. Bull*. 62, 2588–2597. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22001295.

Elert A.M., Becker, R., Duemichen, R., Eisentraut, P., Falkenhagen, J., Sturm, H., Braun, U. (2017) Comparison of different methods for MP detection: what can we learn from them, and why asking the right question before measurements matter? *Environ. Pollut*. 231 1256-1264. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.08.074.

Eriksen, M., Lebreton, L.C.M., Carson, H.S. (2014). Plastic pollution in the world's oceans: more than 5 trillion plastic pieces weighing over 250,000 tons afloat at sea. PloS One 9 (12), 11-19.

Galgani, F., Burgeot, T., Bocquene, G., Vincent, F., Leaute, J.-P., Labastie, J., Forest, A., Guichet, R. (1995). Distribution and abundance of debris on the continental shelf of the Bay of Biscay and in Seine Bay. *Mar. Pollut. Bull*. 30 (1), 58–62. https://doi.org/ 10.1016/0025-326X(94)00101-E.

Hartmann, N.B., Huffer, T., Thompson, R.C., Hassellov, M., Verschoor, A., Daugaard, A.E., Rist, S., Karlsson, T., Brennholt, N., Cole, M., Herrling, M.T., Hess, M.C., Ivleva, N.P., Lusher, A.L., Wagner, M. (2019). Are we speaking the same language? Recommendations for a definition and categorization framework for plastic debris. *Environ. Sci. Technol*. 53, 4678–4679.

Landrigan, P.J., Stegeman, J.J., Fleming, L.E., Allemand, D., et al. (2020). Human Health and Ocean Pollution. *Ann. Glob. Health* 86, 151, 1–64.

Masura, J., Baker, J., Foster, G., Arthur, C. (2015). Methods for the Analysis of Microplastics in the Marine Environment: Recommendations for Quantifying Synthetic Particles in Waters and Sediments, vol. 48, NOAA Technical Memorandum NOS-OR&R.

Mendoza, A., Osa, J.L., Basurko, O., Rubio, A., Santos, M., Gago, J., Galgani, F., Peña, C. (2020). Microplastics in the Bay of Biscay: An overview. *Mar. Pollut. Bull*. 153, 110996.

MSFD Technical Subgroup on Marine Litter, Guidance on Monitoring of Marine Litter in European Seas. A Guidance Document within the Common Implementation Strategy for the Marine Strategy Framework Directive, European Commission, 2013.

Phuong, N.N., Poirier, L., Lagarde, F., Kamari, A., Zalouk-Vergnoux, A., (2018). Microplastic abundance and characteristics in French Atlantic coastal sediments using a new extraction method. *Environ. Pollut*. 243, 228–237. https://doi.org/10. 1016/j.envpol.2018.08.032.

Thompson, R., Moore, C., vomSaal, F., Swan, S. (2009). Plastics, the environment and human health: current consensus and future trends. Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. 364, 2153–2166. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2873021/.

Von Moos, N., Burkhardt-Holm, P., Koehler, A. (2012). Uptake and effects of microplastics on cells and tissues of the blue mussel Mytilus edulis L. after experimental exposure. *Environ. Sci. Technol*. 46, 11327–11335. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22963286.

Wang, J., Zheng, L., Li, J. (2018). A critical review on the sources and instruments of marine microplastics and prospects on the relevant management in China. Waste Manag. Res. 36 (10), 898–911.

Wright, S.L., Thompson, R.C., Galloway, T.S. (2013). The physical impact of micro-plastics on marine organisms: a review. *Environ. Pollut*. 178, 483–492. https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0269749113001140.

7. Eskerrak eta oharrak

Lan hau PID2020-118685RB-I00 kodea duen PLASTeMER akronimodun ikerketa-proiektuaren babesean egin da, Espainiako Zientzia eta Berrikuntza Ministerioak finantzatua izan dena.

Bestetik, Ikasiker bekaren diru laguntzaz lagundutako proiektua izaki, eskerrak eman Eusko Jaurlaritzari.

Konposatu per- eta polifluoratuen esposizioa haurtzaroan. Osasun publikoko estrategia esposomiko bat ikertzen

Anne San Román Martínez [1,2], Eunate Abilleira Cillero[1], Amaia Irizar Loibide[1],
Belen Gonzalez-Gaya [2], Nestor Etxebarria Loizate[2]
[1]IIS Biodonostia (Donostia, Gipuzkoa)
[2]Euskal Herriko Unibertsitatea (UPV/EHU) (Leioa, Bizkaia)
annesanroman@gmail.com

Laburpena

Konposatu per- eta polifluoroalkilikoak (PFAS) karbono erabat fluoratua eta buru hidrofilo bat duten konposatu sintetikoak dira, 40ko hamarkadatik oso erabiliak izan dira kontsumo-ondasun anitzetan. Beren ezaugarri anfipatikoengatik, ia populazio guztiaren odol edo gernuan aurkitu ohi dira, dieta eta edateko ura izanik esposizio-iturri nagusiak. Milaka PFAS existitu arren, gutxi batzuk monitorizatu ohi dira, haiekiko esposizioa gutxietsi daitekeela iradokiz. Bestalde, maila subhilgarriekiko esposizio kronikoak umeetan osasun-arazoak eragin ditzake, hala nola, disrupzio endokrinoa edo ikasteko desgaitasuna. Hortaz, lan honen helburua PFAS espektro zabala kuantifikatzea da, Gipuzkoako 4 eta 8 urteko haurren plasman. Lortutako behin-behineko emaitzetan (n=450) denetariko PFASak topatu dira, kontzentrazio ezberdinetan, eta sexu eta adinaren arabera aldakorrak.

Hitz gakoak: PFAS, LC-HRMS, haurrak, plasma.

Abstract

Per- and polyfluoroalkyl compounds (PFASs) are synthetic compounds featured by at least one fully fluorinated carbon attached to a hydrophilic head, that have been widely used since the 1940s in a variety of consumer goods. Due to their amphipathic behavior, they are commonly found in the blood or urine of almost all population, being diet and drinking water the main sources of exposure. Although thousands of PFAS exist, only a few are monitored, suggesting that exposure can be underestimated. On the other hand, chronic exposure to sublethal levels can cause health problems in children, such as endocrine disruption or learning disability. Thus, the aim of this work is to quantify a broad spectrum of PFAS in 4- and 8-years children's plasma samples from Gipuzkoa. Preliminary results (n=450) have shown presence of PFAS from different families at different concentrations, varying according to sex and age.
Keywords: PFAS, LC-HRMS, children, plasma.

1. Sarrera eta motibazioa

Konposatu per- eta poli-fluoratuak, edo PFASak, 40ko hamarkadan sortu ziren konposatu sintetikoen familia bat osatzen dute, haien egiturak, propietate bereziak ematen dizkie, besteak beste, egonkortasun kimikoa eta termikoa, disolbagarritasuna eta mugikortasuna uretan eta baita propietate tentsoaktiboak eta ez-itsaskorrak ere (Cheremisinoff, 2016). Arrazoi horiengatik, erabili dira hainbat aplikaziotan, hala nola janari lasterreko ontzietan, suaren aurkako materialetan, arropa iragazkaitzetan (Gore-Tex) edo zartagin ez-itsaskorretan (Tefloia), besteak beste (Buck et al., 2021). Erabilera zabal eta intentsibo honek nonahiko presentzia eman die inguruan. Gainera, C-F lotura ezagutzen den lotura indartsuenetariko bat da, PFASen kate perfluoratua berez "suntsiezina" bihurtzen duena (Cousins et al., 2019). Horri esker, egiaztatu da PFAS batzuk milaka urte behar izan ditzaketela naturan hausteko, oso iraunkorrak izanik eta biometaketa eraginez bai ingurumenean bai organismo bizidunetan, efektu toxikoak eragin ditzaketenak esposizio kroniko baten ondorioz (Baker eta Knappe, 2022).

Beren portaera anfipatikoa dela eta, proteinei lotuago egoten dira lipidoei baino, eta erraz banatzen dira ia populazio guztietako odolean edota gernuan, dieta eta edateko ura direlarik esposizio-iturri nagusiak (Brusseau, 2019). Ezagutzen diren 4000 PFAS baino gehiagoren artean, gutxi batzuk baino ez dira erregulatzen eta kontrolatzen, esposizioa gutxietsi daitekeela iradokiz (Peng et al., 2021). Aurkikuntza horiek PFASen esposizio kronikoaren balizko ondorio kaltegarriak aztertzea ekarri zuten,

eta horrek osasun arazoak sor ditzakeela iradokitzen dute, hala nola kolesterol maila handitzea, ugalkortasuna gutxitzea eta haurren jaiotza-pisu txikiagotzea, besteak beste (Australian Government, 2020). Konposatu horiekiko esposizio goiztiarrari dagokionez, hainbat osasun-arazorekin lotu da, hala nola nahasmendu endokrinoarekin, garuneko akatsekin edo portaera-zailtasunekin. Hala ere, kasu batzuetan, osasun-arazoen eta haurren PFASekiko esposizioaren arteko lotura ez da guztiz ezagutzen, eta horrek zalantzan jartzen du azalpen-ebaluazioa (Manzano-Salgado et al., 2019). Haurren esposizio-iturriei dagokienez, dieta eta ingurumenarekiko esposizioaz gain, haurdunaldian eta hazkundean ere gerta daitezke, PFAS transferitu baitaiteke edoskitzaroan, eta baita plazenta-hesia zeharkatuta ere haurdunaldian (Li et al., 2020).

Hau guztia kontuan izanda, ezinbestekoa da konposatu hauen monitorizazioaren ikuspegia handitzea eta ez soilik legedi baten menpean dauden konposatuak aztertzea baizik eta espektro zabalago bat kontuan izatea. Horretarako, gaur egungo tresna analitikoez baliatuz eta laborategiko analisi egoki bat diseinatuz, konposatu hauen presentzia haurren plasman detektatzeko metodo analitiko bat prestatzea premiazkoa da geroago lortutako datuak analisi epidemiologiko batean erabili ahal izateko.

2. Arloko egoera eta ikerketaren helburuak

Gaur egungo ikerketek erakutsi duten moduan PFASak, azken batean, substantzia iraunkor bihurtzen dira, eta horrek atzeraezineko ingurumen-esposizioa eta -metaketa eragiten ditu. Uraren disolbagarritasuna eta mugikortasuna direla eta, EBn lurrazaleko, lurpeko eta edateko uraren eta lurzoruaren kutsadura gertatu da, bai eta mundu mailan ere, eta hala jarraituko du neurriak hartu ez izanez gero. Frogatu da oso zaila eta oso garestia dela PFASak kentzea ingurunera isurtzen direnean. Gainera, PFAS batzuk substantzia toxiko edota biometagarri gisa dokumentatu dira, bai giza osasunari dagokionez, aipatu bezala, bai ingurumenari dagokionez. Ekintzarik egin gabe, kontzentrazioak handitzen jarraituko du, eta ondorio toxiko eta kutsatzaileak zailak izango dira (Domingo eta Nadal, 2019; Wang et al., 2021). Hori dela eta, gero eta kontzientzia handiagoa dago PFAS presentziari buruz eta horregatik Europako Produktu Kimikoen Agentziak (ingeleseko siglatik *European Chemicals Agency*, ECHA) aurten PFAS batzuren fabrikazioa mugatzeko proposamena argitaratu du (ECHA, 2015; European Chemicals Agency (ECHA), 2019) . Hala ere, industriek neurri hauei aurre egiteko eta irabaziak ez galtzeko, ordezko espezieak diseinatu dituzte, gaur egun PFAS emergenteak izenekoak. Gaur egun, aukera horiek sintetizatzen ari dira arrisku gutxiago izateko, aplikazio askotan beharrezkoak diren ezaugarriei uko egin gabe. Gauzak horrela, PFASen ordezkapenen hazkundeak, kate laburragoak edo ahalmen biometagarri txikiagoa duten alternatibak barne, handitu egin du esposizioa eta identifikazio-prozedura zabalagoen beharra (Newton et al., 2017).

Arlo honetan, INMA Proiektua (gazteleratik Infancia y Medioambiente), ingurumen-faktoreen eta haurren osasunaren arteko lotura aztertzen duen proiektu handi bat da bere barnean lan hau hartzen duena. PFASen esposizioari dagokionez, aurreko ikerketetan aurkitu zen PFAS batzuen presentzia, hala nola azido perfluoroktanosulfonikoa (PFOS), azido perfluooktanoikoa (PFOA), azido perfluorononanoikoa (PFNA) eta azido perfluorohexanosulfonikoa (PFHxS), haurdun zeuden emakumeen plasman. Era berean, 2004 eta 2019 artean konposatu horiek eta azido perfluorobutanosulfonikoa (PFBS) haurdunaldian, jaiotzan eta haurtzaroko lehen etapetan ere aurkitu ziren, eta horrek iradokitzen du konposatu horien presentzia eta haien ondorioak aztertu behar direla. Orain arte, PFAS arautuak bakarrik aztertu dira INMA proiektuan, PFAS espezie emergenteak ere sartu behar direla iradokiz, esposizioaren ikuspegi zabalagoa izateko (Manzano-Salgado et al., 2016, Manzado-Salgado et al., 2019).

INMAn ez ezik, Espainian ere aztertu da konposatu hauen presentzia beste biomonitorizazio-programa batzuetan, hala nola BIOAMBIENT.ES (Argelia Castaño et al., d. g.). Azterlan honetan, PFASen presentziaren emaitza konparatiboak argitaratu dira, bai Espainiako erkidegoetan, bai esparru globalago batean. Lortutako emaitzek serumetan konposatu horien maila kezkagarriak erakusten dituzte, batez ere honako konposatu hauek detektatzen direla adieraziz: PFHxS, PFOA, PFOS, PFNA, PFDA, N-MeFOSA Espainiako populazioan, eta: PFHxS, PFOA, PFOS, PFNA eta PFDA maila globalean.

Konposatu hauen analisia, normalean, kromatografia likidoa eta tandem masa-espektrometria (LC-MS/MS) bidez egiten da, elektrospray ionizazioarekin; hala ere, metodo honek interferentziak eta

ziurgabetasun esanguratsuak izan ditzake multitarget hurbilketetan, aztarna-mailetan, hau da, ppb edo ppt (Liang et al., 2020). Gaur egun eskura ditugun tresna analitikoek, hala nola kromatografia likidoak eta bereizmen handiko masa-espektrometriak (HRMS), interferentziak murrizteaz gain, aldez aurretik definitutako substantzien bilaketa (analisi zuzendua edo bideratua) eta hasierako bilaketan sartu gabeko substantzien "a posteriori" ebaluazioa (susmagarrien analisia) konbinatzeko aukera ematen digute, baita beste substantzia ezezagun batzuena ere (analisi ez zuzendua) (Chiumiento et al., 2023). Tresna honekin PFAS arautuaren presentzia azter daiteke, baita selektibitate, bereizmen eta sentsibilitate handiko espezie emergenteen presentzia ere. Zentzu horretan, gure helburua da Gipuzkoako haurren plasma laginetan PFASen presentzia ikertzea. Helburu hori lortzeko, gure lehen ahalegina izan da erauzketa-metodo egoki bat ezartzea, analisi-metodo instrumental batekin batera, ahalik eta detekzio- eta kuantifikazio-muga txikienetara iristeko eta ondoren lagin errealetan aplikatzeko.

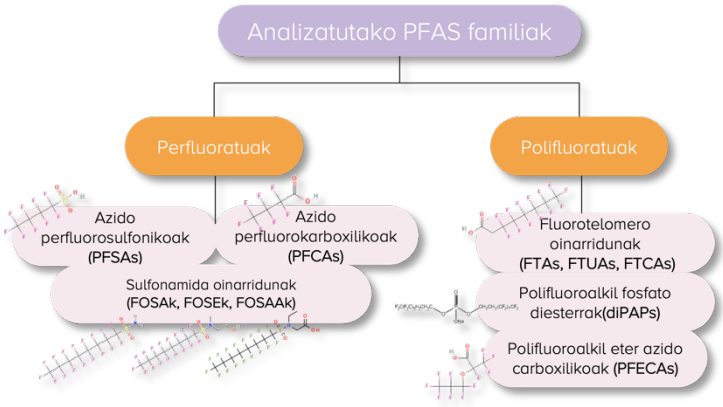
3. Ikerketaren muina

Lan honetan PFASak plasma laginetan aztertzeko metodoa optimizatu nahi da. Helburua, konposatu horien espektro ahalik eta zabalena kuantifikatzea ahalbidetuko duen metodo bat lortzea da, haurren plasma-laginetan aplikatu ahal izateko.

3.1. Erauzketa metodoaren optimizazioa

Analisi bideratua bereizmen altuko Orbitrap detektagailua duen likido kromatografo batean (HPLC-HRMS) optimizatu zen, familia ezberdinetako 42 PFASentzat. Haien artean: azido sulfoniko perfluoroalkilikoak (PFSA), azido karboxiliko perfluoroalkilikoak (PFCA), sulfonamida eta sulfonaetanamida oinarria duten konposatu perfluoroalkilikoak (FOSAk, FOSEak, FOSAAak), fluorotelomeroetan oinarritutako substantziak (FTAak, FTUAak, FTCA), fosfato-diester polifluoroalkiloak (diPAP) eta azido karboxiliko polifluoroalkilikoak (PFECA). Haien artean, konposatu sortu berriak edo emergenteak ere baziren, hala nola ADONA edo HFPO-DA (GenX), besteak beste (1. irudia).

1. irudia. Optimizatutako PFAS konposatuen familia ezberdinak eta haien klasifikazioa egituraren arabera.



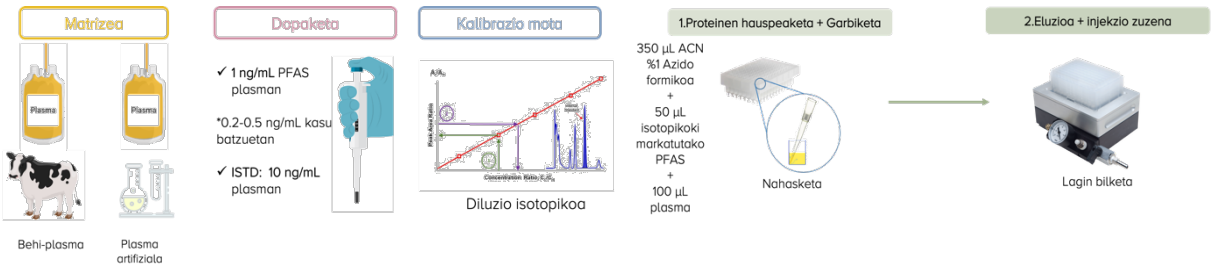
Plasma-laginetan, funtsezkoa da lagin-bolumen txikiak eta kontzentrazioak kontuan hartzea prozedura analitikoa diseinatzeko orduan; aztarna-mailan dauden konposatuak erauzteko metodorik egokiena eta sinpleena aukeratzeko. Horretarako, hiru erauzketa protokolo konparatu ziren, bakoitza aldez aurretik bilaketa bibliografikoa egin ondoren aukeratuta kontuan izanda zailtasuna/erraztasuna eta analito ezberdinak erauzteko ahalmena. Erauzketa metodoak bi plasma matrize ezberdinak erabiliz, behi-plasma eta plasma artifiziala, konparatu ziren. Horretarako plasma horiek kontzentrazio ezberdinetara dopatu ziren, eta lortutako errekuperazioak aztertu ziren metodo egokiena aukeratzeko kontuan izanda hainbat faktore, besteak beste analito familia ezberdinak erauzteko gaitasuna eta laborategi eskalan lagin anitzetan aplikagarria izatea (2. irudia).

Laburki, hiru metodo frogatu ziren: lehenengoan azetonitriloa erabiliz bi proteinen hauspeaketa sekuentziala eta erauziaren garbiketa burutzen zen karbono grafitizatua EnviCarb © erabiliz (Miaz et al., 2020), azkenik erauzi garbiaren aurrekontzentrazio bat eginez N_2 korrontearekin. Bigarrenan fase solidoko mikro-erauzketa sinple batean oinarritzen zen, Captiva ® (Zhao eta Juck, d. g.) oinarridun 96ko SPE platerra erabiliz lagina arinki azidifikatutako azetonitriloarekin nahasi ostean (2. irudia). Eta hirugarrenean, metanola erabiltzen zen proteinen hauspeaketarako (Frigerio et al., 2022) eta zuzenean gain jalkina injektatzen zen. Orokorrean aipatutako metodoetan oinarritutako lanek ez dute kontuan hartzen PFAS familia guztiak edo gutxi batzuk soilik analizatzen dituzte. Hori dela eta, konprobatu behar zen aldez aurretik hautatutako metodoen artean zeintzuk balio zuten gure PFASen zerrendarako.

Analisi instrumentala Q Exactive Hybrid Quadrupole-Orbitrap LC-MS masa espektrometro bati lotutako Vanquis kromatografo batean egin zen (Thermo Fisher, Alemania). Banaketa kromatografikoa fase urtsu bat (A) erabiliz egin zen, % 95eko ur ultrapuruarekin eta % 5eko azetonitriloarekin, eta fase organiko bat (B) % 95eko azetonitriloarekin eta % 5eko ur ultrapuruarekin, gradientean zehar nahasketa baldintza hobeak izateko. Bi faseak 2 mMko amonio azetatoarekin eraldatu ziren. Gradientea B fase mugikorraren % 1ekin hasten zen, minutu batez mantendu zena, eta 15 minutuko arrapala bat egin zen B % 95era iritsi arte, 20 minutura arte mantendu zena. Hasierako baldintzak 5 minututan berreskuratu ziren eta 5 minutu gehiago behar izan ziren hasierako konposizioa egonkortzeko, 30 minutuko kromatograma lortuz.

Lortutako emaitzen arabera erabaki zen fase solidoko mikro-erauzketa Captiva ® metodoa azkarragoa eta sinpleagoa zela beste prozedurekin alderatuz. Gainera, PFAS familia ezberdinak kuantifikatzeko egokia zela egiaztatu zen, izan ere beste metodoek errekuperazio baxuagoak erakutsi zituzten PFAS familia batzuentzat (FTA, FTUA, FOSAAk, PFECAk). Bestalde, laginen arteko aldagarritasun gutxiago erakusten zuen eta errepikakorragoa zela erakutsi zuen, baldintza hauek ezinbestekoak izanda mota honetarako analisietan. Azkenik, metodo honen berezitasuna besteekiko da 100 µL lagin bakarrik behar direla, garrantzitsua dena mota honetako lagin biologikoen bolumena erauzketa prozesuaren mugatzailea izan ohi delako kasu askotan. Beraz, erauzketa metodo hau egokia suertatzen da ehunka laginetan oinarritzen diren analisi epidemiologikoetan aplikatzeko era eraginkor eta azkar batean.

2. irudia. Ezkerrean, erabilitako metodoaren optimizaziorako laburpena eta eskuinean aukeratutako metodoaren deskribapena.



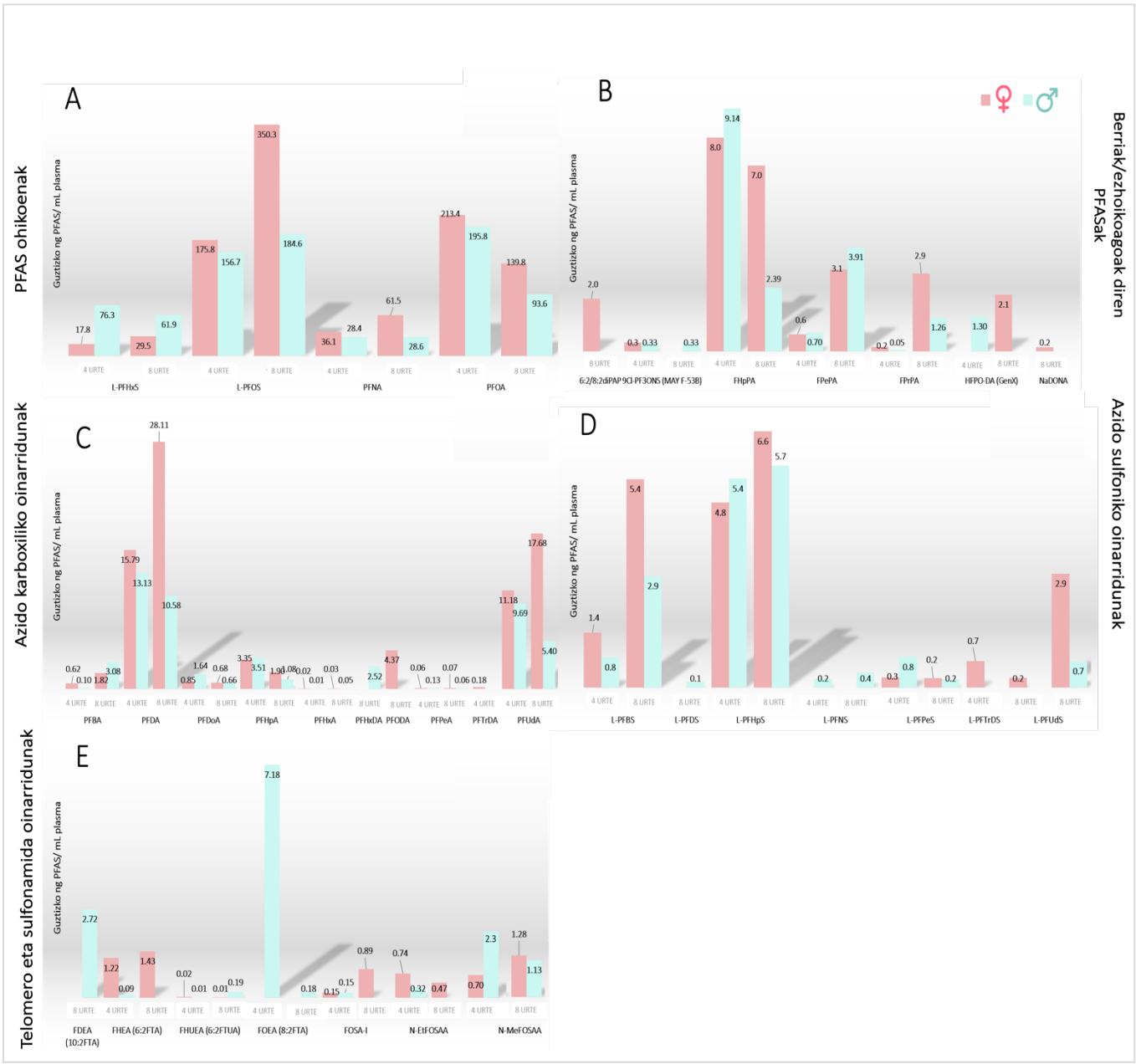
3.2. Plasma lagin errealetan lortutako behin-behineko emaitzak

Behin laginen erauzketa metodoa zehaztuta, horren balidazioa egin zen non linealtasuna, sentikortasuna (detekzio eta kuantifikazio mugak), errepikakortasuna, zehaztasuna eta metodoaren ziurgabetasuna kalkulatu zen kontzentrazio tarte ezberdinak erabiliz (0.025-10 ng/mL). Hori egin eta gero, Gipuzkoa kohorteko haurren 450 laginen analisia burutu genuen. Horretarako gure balidazioaz gain lagin dopatuak erabiliz, ere erreferentziazko materialen (NIST CRM 1950 ®) analisiak zein laborategi arteko programa batean parte hartu genuen (AMAP Ring Test for Persistent Pollutants) gure metodoaren emaitza egokien berrespena lortuz.

3. irudian aurkezten dira Atik Era lortutako plasma laginen behin-behineko emaitzak, erakusten diren emaitzak, laginetan neurtutako PFASen guztizko kontzentrazioak edo kontzentrazio metatuak detektatutako konposatu bakoitzerako adinaren eta sexuaren arabera. Emaitza hauek behin-behinekoak

dira baina balio digute jakiteko konposatu hauen presentzia badagoen eta ikusteko ea adinarekin edota sexuarekin aldatzen den.

3. irudia. 4 eta 8 urteko umeen plasma laginetan detektatutako PFASen kontzentrazio metatuak (n=450).



3A irudian ikus daitekeenez, L-PFOS eta PFOA konposatuak dira kontzentrazio handiena dutenak 4 eta 8 urteko haurretan. Hala ere, ikus daiteke PFOAren kasuan kontzentrazioak behera egiten duela adinean gora egin ahala, eta guztizko kontzentrazioa txikiagoa dela mutiletan nesketan baino. L-PFOSen kasuan, sexuaren joerak bere horretan jarraitzen duela ikusten da, baina kasu horretan guztizko kontzentrazioak gora egiten du adinarekin batera.

PFNAren kasuan, mutilen kasuan guztizko kontzentrazioak mantendu egiten dira adin desberdinetarako, eta nesken kasuan, berriz, handitu egiten dira adinarekin. PFHxS-en arabera, nesken kasuan guztizko kontzentrazioak gora egiten du adinak gora egin ahala, eta mutilen kasuan pixka bat behera egiten du, adinarekin.

Hain ohikoak ez diren PFASen kasuan (3B irudia), PA (azido propanoikoa) terminazioa duten konposatuak gainerakoak baino gehiago agertzen dira, batez ere FPrPA. Bestalde, PFAS espezie berrienak edo emergenteenak, hala nola HFPO-DA (GenX), 6:2/8: 2diPAP edo NaDONA (ADONA), neskengan bakarrik detektatu dira, GenX izan ezik, bi sexuetan detektatu baita. 9Cl-PF3ONS-en kasuan, bi adinetako kontzentrazio oso antzekoetan detektatu da.

Azido karboxilikoen kasuan (3C irudia), kontzentraziorik handiena duten konposatuak kate alkiliko luzeena dutenak izan dira, eta hori biometaketa handiagoarekin lotzen da, apolarragoak baitira, hala nola PFDA eta PFUdA, hamar eta bederatzi karbonorekin hurrenez hurren. Bi konposatuen kontzentrazioak gora egiten du adinarekin nesketan eta behera mutiletan.

Konposatu sulfonikoen kasuan (3D irudia), L-PFBS eta L-PFHpS dira presentzia handiena dutenak. Kasu horretan, berriz ere ikusten dugu nesken kontzentrazioa handitu egiten dela adinarekin batera, eta gauza bera gertatzen da mutilen kasuan L-PFBSren kasuan, baina ez PFHpS-en kasuan, adin ezberdinetan antzera mantentzen baita mutilen kasuan. Familia horretako gainerako konposatuak kontzentrazio txikiagoan agertzen dira, PFUdS izan ezik, 8 urteko nesketan kontzentrazio altuagotan agertzen baita.

Azkenik, FTA, FTUA, FOSA, FOSAA familietako konposatuen kasuan (3E irudia), ikus dezakegu FOEAren kasuan (8: 2FTA) mutilengan bakarrik detektatu dela eta haien kontzentrazioa dramatikoki murrizten dela adinarekin. Antzeko zerbait ikusten dugu FHEArako (6: 2FTA), baina kasu honetan kontzentrazioa antzekoa da eta neskengan bakarrik detektatu dugu. FDEAren kasuan (10:2 FTA) 8 urteko haurrengan bakarrik detektatu dugu. Azkenik, N-MeFOSAAren kasuan, kontzentrazio handiagoetan agertzen da 4 urteko mutiletan.

4. Ondorioak

Laburbilduz, metodo analitiko optimizatu bat lortu da 42 PFAS era bideratuan kuantifikatzeko sentikortasun eta selektibitate handiko aztarna-mailetan (ng/mL, pg/mL) bereizmen altuko likido kromatografia bidez. Gainera, optimizatutako erauzketa-protokoloa ahalbidetzen du plasma laginak analizatzea lagin bolumen oso txikiak erabiliz, kontuan izanda ospitale-sare batetik lortzen diren lagin bolumen txikiak desabantaila bat izan daitekeela prozedura analitikoa diseinatzeko orduan.
Arestian aipatutako guztia guztiz egiaztatuta geratu da laborategien arteko saiakuntzetan, AMAP Ring Test for Persistent Pollutants, parte hartu izanari esker. Izan ere, lortutako emaitzak egokiak izan ziren eta gure neurketen trazagarritasuna bermatzen dute. Azkenik, orain arte analizatutako haurren laginek agerian jarri dute konposatu hauen monitorizazioa beharrezkoa dela, hauen presentzia analizatutako laginen ehuneko nabarmen batean agertu delako. Etorkizunean Gipuzkoako kohorte osoko laginen analisia burutu ostean eta datuen tratamendu egokia eginez, lortutako emaitzek haurtzaroan PFASen esposizioari buruzko hipotesia argituko dute eta esposizioaren eta osasun arazoen arteko lotura argitzen lagunduko digute.

5. Etorkizunerako planteatzen den norabidea

Lan honetatik abiatuta planteatzen diren erronkak eta bideak hainbat dira; alde batetik plasma laginei dagokionez, lortu diren PFAS analisien emaitzak umeen bizimodu eta osasun-egoerekin lotzea posiblea den heinean. Bestalde, plasma laginetan beste kutsatzaileen presentzia aztertzea susmagarrien analisi baten bidez, aprobetxatuz lagin hauen eskuragarritasuna eta baliozkotasuna analisi esposomiko baterako. Eta azkenik, kontsumorako urak analizatzeko protokolo bat optimizatzea PFASen presentzia umeen bizilekuetan aztertzeko eta gaur egungo esposizio iturrien berri izateko.

6. Erreferentziak

Argelia Castaño, Marta Esteban-López, Juan J. Ramos, Beatriz Pérez-Gómez, Eva Calvo, Miguel Motas, Silvia Gómez, Susana Pedraza-Díaz, & Ana I. Cañas. (s. f.). *Exposición a sustancias químicas en población adulta española: Resultados de BIOAMBIENT.ES.*

Australian Government. (2020). *Per- and poly-fluoroalkyl substances (PFAS). Health effects and exposure pathways*. Australian Government Department of Health and Ageing. https://www1.health.gov.au/internet/main/publishing.nsf/Content/ohp-pfas.htm

Baker, E. S., & Knappe, D. R. U. (2022). Per- and polyfluoroalkyl substances (PFAS)—Contaminants of emerging concern. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, *414*(3), 1187-1188. https://doi.org/10.1007/s00216-021-03811-9

Brusseau, M. L. (2019). The influence of molecular structure on the adsorption of PFAS to fluid-fluid interfaces: Using QSPR to predict interfacial adsorption coefficients. *Water Research*, *152*, 148-158. https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.12.057

Buck, R. C., Korzeniowski, S. H., Laganis, E., & Adamsky, F. (2021). Identification and classification of commercially relevant per- and poly-fluoroalkyl substances (PFAS). *Integrated Environmental Assessment and Management*, *17*(5), 1045-1055. https://doi.org/10.1002/ieam.4450

Cheremisinoff, N. P. (2016). *Perfluorinated Chemicals (PFCs): Contaminants of Concern*. John Wiley & Sons. https://books.google.es/books?id=RIOyDQAAQBAJ&printsec=frontcover&dq=Perfluorinated+Chemicals+(PFCs):+Contaminants+of+Concern&hl=es&sa=X&ved=2ahUKEwi9rPeBk7XuAhV88eAKHdfxDdkQ6AEwAHoECAUQAg#v=onepage&q=Perfluorinated%20Chemicals%20(PFCs)%3A%20Contaminants%20of%20Concern&f=false

Chiumiento, F., Bellocci, M., Ceci, R., D'Antonio, S., De Benedictis, A., Leva, M., Pirito, L., Rosato, R., Scarpone, R., Scortichini, G., Tammaro, G., & Diletti, G. (2023). A new method for determining PFASs by UHPLC-HRMS (Q-Orbitrap): Application to PFAS analysis of organic and conventional eggs sold in Italy. *Food Chemistry*, *401*, 134135. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.134135

Cousins, I. T., Ng, C. A., Wang, Z., & Scheringer, M. (2019). Why is high persistence alone a major cause of concern? *Environmental Science: Processes & Impacts*, *21*(5), 781-792. https://doi.org/10.1039/C8EM00515J

Domingo, J. L., & Nadal, M. (2019). Human exposure to per- and polyfluoroalkyl substances (PFAS) through drinking water: A review of the recent scientific literature. *Environmental Research*, *177*, 108648. https://doi.org/10.1016/j.envres.2019.108648

ECHA, E. (2015). *Committee for Risk Assessment (RAC) Committee for Socio-economic Analysis (SEAC) Background document to the Opinion on the Annex XV dossier proposing restrictions on Perfluorooctanoic acid (PFOA), PFOA salts and PFOA-related substances.* https://echa.europa.eu/documents/10162/02d5672d-9123-8a8c-5898-ac68f81e5a72

European Chemicals Agency (ECHA). (2019). *Annex XV report. Proposal for identification of a sustance of very high concern on the basis of the criteria set out in article 57*. European Chemicals Agency (ECHA).

Frigerio, G., Cafagna, S., Polledri, E., Mercadante, R., & Fustinoni, S. (2022). Development and validation of an LC–MS/MS method for the quantitation of 30 legacy and emerging per- and polyfluoroalkyl substances (PFASs) in human plasma, including HFPO-DA, DONA, and cC6O4. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, *414*(3), 1259-1278. https://doi.org/10.1007/s00216-021-03762-1

Li, Y., Yu, N., Du, L., Shi, W., Yu, H., Song, M., & Wei, S. (2020). Transplacental Transfer of Per- and Polyfluoroalkyl Substances Identified in Paired Maternal and Cord Sera Using Suspect and Nontarget Screening. *Environmental Science & Technology*, *54*(6), 3407-3416. https://doi.org/10.1021/acs.est.9b06505

Liang, M., Xian, Y., Wang, B., Hou, X., Wang, L., Guo, X., Wu, Y., & Dong, H. (2020). High throughput analysis of 21 perfluorinated compounds in drinking water, tap water, river water and plant effluent from southern China by supramolecular solvents-based microextraction coupled with HPLC-Orbitrap HRMS. *Environmental Pollution*, *263*. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.114389

Manzano-Salgado, C. B., Casas, M., Lopez-Espinosa, M.-J., Ballester, F., Martinez, D., Ibarluzea, J., Santa-Marina, L., Schettgen, T., Vioque, J., Sunyer, J., & Vrijheid, M. (2016). Variability of perfluoroalkyl substance concentrations in pregnant women by socio-demographic and dietary factors in a Spanish birth cohort. *Environment International*, *92-93*, 357-365. https://doi.org/10.1016/j.envint.2016.04.004

Manzano-Salgado, C. B., Granum, B., Lopez-Espinosa, M.-J., Ballester, F., Iñiguez, C., Gascón, M., Martínez, D., Guxens, M., Basterretxea, M., Zabaleta, C., Schettgen, T., Sunyer, J., Vrijheid, M., & Casas, M. (2019). Prenatal exposure to perfluoroalkyl substances, immune-related outcomes, and lung function in children from a Spanish birth cohort study. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, *222*(6), 945-954. https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2019.06.005

Miaz, L. T., Plassmann, M. M., Gyllenhammar, I., Bignert, A., Sandblom, O., Lignell, S., Glynn, A., & Benskin, J. P. (2020). Temporal trends of suspect- and target-per/polyfluoroalkyl substances (PFAS), extractable organic fluorine (EOF) and total fluorine (TF) in pooled serum from first-time mothers in Uppsala, Sweden, 1996–2017. *Environmental Science: Processes & Impacts*, *22*(4), 1071-1083.

https://doi.org/10.1039/C9EM00502A

Newton, S., McMahen, R., Stoeckel, J. A., Chislock, M., Lindstrom, A., & Strynar, M. (2017). Novel Polyfluorinated Compounds Identified Using High Resolution Mass Spectrometry Downstream of Manufacturing Facilities near Decatur, Alabama. *Environmental Science and Technology*, *51*(3), 1544-1552. https://doi.org/10.1021/acs.est.6b05330

Peng B., Hong W., Li F., Li M., & Guo L. (2021). Distribution characteristics and health risk assessment of perfluoroalkyl substances in aquatic environment of Hangzhou-Jiaxing-Huzhou region in Zhejiang Province. *Environmental Chemistry*, 3001-3014. https://doi.org/10.7524/j.issn.0254-6108.2021032002

Wang, Y., Li, X., Zheng, Z., Shi, Y., & Cai, Y. (2021). Chlorinated polyfluoroalkyl ether sulfonic acids in fish, dust, drinking water and human serum: From external exposure to internal doses. *Environment International*, *157*, 106820. https://doi.org/10.1016/j.envint.2021.106820

Zhao, L., & Juck, M. (s. f.). *Fluid Samples Using Agilent Captiva EMR—Lipid 96-Well Plates*.

7. Eskerrak eta oharrak

Lan hau burutzea posible izan da Espainiako Ikerketa Agentzia Estatalak (AEI) eta Eskualde Garapenerako Europako Funtsak, PID2020-11766RB-C31 proiektuaren bidez, Eusko Jaurlaritzako Osasun Sailak (PID 2021111053) eta Eusko Jaurlaritzak (IT1446-22), Ikerkuntzarako Euskal Sistemaren talde kontsolidatu gisa jaso den dirulaguntzagatik. Anne San Román-ek ere eskerrak ematen dizkio Eusko Jaurlaritzari doktoratu aurreko eskainitako ikerkuntza bekagatik.

Neurofibroma-MPNST progresioaren ikerkuntza induzituriko zelula ama pluripotenteen (iPSC) ereduan oinarritutako sistema erabiliz

Itziar Uriarte-Arrazola[1], Helena Mazuelas[1], Juana Fernández-Rodríguez[2], Miriam Magallón-Lorenz[1], Sara Ortega-Bertran[2], Conxi Lázaro[2], Bernat Gel[1], Meritxell Carrió[1], Eduard Serra[1]

[1]Minbizi Hereditario taldea, Germans Trias i Pujol Ikerketa Institutoa (IGTP), Can Ruti Kanpusa, 08916 Badalona, Bartzelona, Espainia

[2]Minbizi Hereditatio programa, Onkologia Instituto Katalana (ICO-IDIBELL), L'Hospitalet de Llobregat, 08098 Bartzelona, Espainia

iuriarte@igtp.cat (I. U-A.)

Laburpena

Nerbio periferiko zorroaren tumore gaiztoa (*Malignant Peripheral Nerve Sheath Tumor*, MPNST) ehun biguneko sarkoma oldarkorra da eta espontaneoki (%50) edo 1 motako neurofibromatosia (NF1) jasaten duten pertsonek (%50) garatu dezakete. MPNST-en terapian ezinbestekoa da erabateko erresekzioa eta erradioterapia. Hala ere, pronostiko txarra dute eta heriotza-tasa oso altua da. Tumore gaizto hauek osatzen dituzten zelulen genomak berrantolaketa handia dute, hiperploideak dira eta ehuneko oso altu batek *NF1*, *CDKN2A/B* eta PRC2 tumore gene supresoreak inaktibatuta dauzkate. Induzituriko zelula ama pluripotenteak (iPSC) erabiliz eta hiru gene hauek CRISPR-Cas9 teknologiaren bidez mutatuz, MPNST-aren garapenean daukaten funtzioa eta garrantzia ulertu nahi da.

MPNST, NF1, iPSC, NC, CRISPR-Cas9, zelula-lerroak

Abstract

Malignant Peripheral Nerve Sheath Tumor (MPNST) is an aggressive soft tissue sarcoma that can develop equally spontaneously or in Neurofibromatosis type 1 patients. Complete resection with wide margins is essential in MPNST therapy, followed by radiation, but it is not always successful and has a very bad prognosis and high mortality rate. There is a lack of therapeutic options. MPNSTs are composed of hyperploid cells with structural variants and rearranged genomes. Most of them have NF1, CDKN2A/B and PRC2 tumor suppressor genes inactivated. Using induced pluripotent stem cells (iPSCs) and editing the three tumor suppressor genes by CRISPR-Cas9, we aim to understand the function and implication of these genes in the progression of MPNSTs.

MPNST, NF1, iPSC, NC, CRISPR-Cas9, cell lines

1. Sarrera eta motibazioa

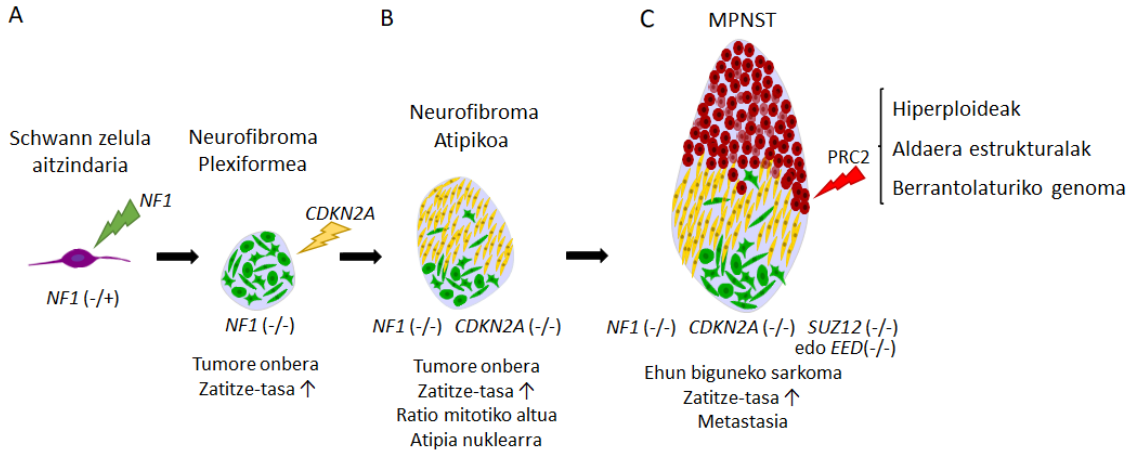
Nerbio periferiko zorroaren tumore gaiztoa (MPNST) ehun biguneko sarkoma da. Tumore hauen %50-a 1 motako neurofibromatosia (NF1) jasaten duten pertsonek garatzen dute. NF1 tumoreak garatzeko joera duen nerbio sistema periferikoko gaixotasun hereditarioa da. Hau da, *NF1* tumore supresore genearen aleloetako bat mutatuta heredatzeagatik sortzen da. Hots, pertsona hauen zelula guztiak *NF1* (+/-) dira. Munduan 1/3500 pertsonek jasaten dute, eta klinikoki, gaixotasun oso heterogeneoa da (Evans et al, 2002). Gaixoek Lisch noduluak garatu ditzakete irisean, edota kafesne orbanak, hezur-arazoak, begiko gliomak, ikasmen nahasmendua eta neurofibroma izeneko tumore onberak, besteak beste. NF1 jasaten duten pertsonen %8-13ak MPNST bat garatzeko arriskua dute, neurofibroma batzuk MPNST tumore gaiztoak bihurtu baitaitezke. Tumore gaizto hauek NF1 gaixotasuna daukatenen heriotza-kausa nagusia da.

Neurofibroma mota ezberdinak daude: alde batetik, azaleko neurofibromak, nerabezarotik aurrera garatzen diren eta azal osoan zehar agertu daitezkeen konkor itxurako tumoreak dira. NF1 gaixoen >%98-ak gutxienez bat garatzen du, eta milaka hazi ahal zaizkie bizi-kalitatea eta autoestimua murriztuz. Beste aldetik, neurofibroma plexiformeak (pNF) daude, sortzetiko tumoreak dira eta gorputzaren barnealdean etengabe hazi daitezke. Bi kasuetan, tumore hauek nerbio baten ondoan hazten dira, eta Schwann zelula aintzindarian *NF1* genea guztiz inaktibatu behar da. Hau da, neurofibromak sortzen eta osatzen dituzten zelulak *NF1*(-/-) dira (1A. irudia).

Neurofibroma plexiformeen kasuan, *CDKN2A* gene tumore supresorea ere guztiz inaktibatzerakoan, neurofibroma atipiko (aNF) izeneko tumorea garatzen da (Beert et at, 2011; Magallón-Lorenz et al, 2021). Hau da, aPN-ak osatzen dituzken zelulak *NF1* (-/-) *CDKN2A* (-/-) dira. Kasu honetan, zelulek zatitze-tasa handiagoa dute, indize mitotiko altua dute eta bereizgarriak diren nukleo handi eta atipikoak izaten dituzte (1B. irudia). Hazkunde azkarreko noduluak dira eta tumore onberak izaten jarraitzen dute. Gainera, pNF-en eta aNF-en zelulek Kresta Neuralaren (NC) eta Schwann zelulen (SC) arteko nortasun zelularra daukate.

aNF-ak aurrera egin dezake eta MPNST bat bilakatu daiteke. Sarkoma oldarkorra da, eta tumorea osatzen duten zelulak hiperploideak dira eta berrantolaturiko genoma daukate. Batez ere aldaera estrukturalak dituzte, baina %80-a polycom II konplexu errepresiboa (PRC2) osatzen duen geneetariko bat (*SUZ12* edota *EED*) guztiz inaktibatuta daukate (1C. irudia). Kasu honetan, histopatologikoki, genomikoki zein adierazpenari dagokionez, zelula mesenkimalen nortasun zelularra daukate (Miettinen et al, 2017; Magallón-Lorenz et al, 2023).

1. irudia. MPNST-aren garapena (Zhang et al, 2020)-tik eraldatua. A) Tumoreen eratorria den Schwann zelula aitzindaria eta neurofibroma plexiformearen sorrera *NF1* genearen inaktibazioaren ondorioz. B) Neurofibroma atipikoaren sorrera *CDKN2A* genearen inaktibazioaren ondorioz. C) MPNST-en sorrera eta ezaugarririk esanguratsuenak.



Orain dela gutxi, pNF-ak tratatzeko MEK bidezidorraren inhibitzailea den Selumetinib farmakoa erabiltzen hasi da, eta tumoreak desagertarazten ez baditu ere, tamainaz murriztea edo gehiago ez haztea lortzen du. Hala ere, ahal den kasuetan, erresekzioa da aukerarik onena. Farmakoak ez du aNF eta MPNST-etan eraginik, eta azkenekoaren kasuan, dagoen tratamendu bakarra erresekzioaren osteko erradioterapia da. Hala ere, 4 urteko epean, soilik %50-30ek bizirauten dute.

Aurretik azaldutako guztia kontuan izanda, gure helburua MPNST-en sorreran hiru gene tumore supresore hauen eragina eta funtzioa ulertzea da. Modu honetan, MPNST-en aurkako ezinbestekoa den terapia eraginkor bat aurkitzetik hurbilago egongo gara.

2. Arloko egoera eta ikerketaren helburuak

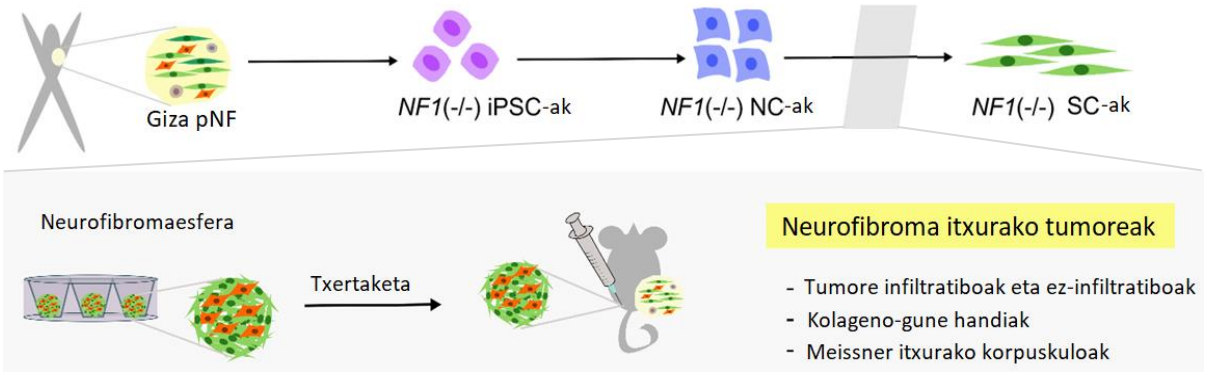
MPNST-en garapena ikertzeko lehenengo pausua eredu on bat izatea da. Alde batetik, tumore guzti hauen eratorria den Schwann zelula aitzindaria zein den jakin eta kultibatu behar da. Beste alde batetik, zelulek garapen eta ezberdintze prozesua jarraitzeko aukera ematen duen eredua behar da. Eta azkenik, hiru tumore supresoreak inaktibatzeko eredu moldakorra beharrezkoa da.

Gaur egun, MPNST-ak ikertzeko hainbat eredu daude. Alde batetik zelula primarioak daude, baina *in vitro* denbora epe motzetan soilik kultibatu daitezke. Hilezkorturiko zelulak ere erabiltzen dira. Hauek *in vitro* etengabe hazi daitezke, eta geneak arazorik gabe editatu daitezke. Baina hilezkortze prozesuak aldaketa biologiko ugari dakartza, eta horrek MPNST-en garapenaren ikerketa asko mugatzen du. Ikerketa arlo honetan ere, animali ereduak (batez ere sagu ereduak) erabiltzen dira. MPNST-en garapena ikertzeko behar diren ezaugarri guztiak betetzen dituzte, baina prozesu biologiko honetan arratoi eta giza zelulen arteko ezberdintasunak nabarmenak dira, eta lortu daitezkeen ondorioak mugatuak dira.

Induzituriko zelula ama pluripotenteak (iPSC) erabilera anitzeko erreminta da. Zelula iturri amaigabea da, beste edozein zelula motatara ezberdindu daitezke (neuronak, adipozitoak, osteozitoak, etab.), eta MPNST-en eratorriak diren zelulak ezagutu, ulertu eta kultibatzeko aukera paregabea da.

Gure laborategian, *NF1*(-/-) giza iPS zelulak erabiliz, pNF-ak ikasteko 3D eredua sortu da (Carrió et al, 2019; Mazuelas et al, 2022). Schwann zelula aitzindariak lortzeko, iPS zelulak Kresta Neurala (NC) izeneko zelula multipotenteetara ezberdintzen dira. Hauek soilik oso zelula espezifikoetara ezberdindu daitezke: zelula mesenkimaletara, pigmentarioetara, adipozitoetara, kondrozitoetara… eta guri interesatzen zaizkigun Schwann zeluletara. Laborategian 3D eredua sortzeko, zelulak NC-etatik SC-tara ezberdintzeko prozesuan, zelulak esferoideak sortzeko plaketan hazten dira pNF-etatik eratorritako fibroblastoekin batera kultibatuz. Modu honetan, neurofibromaesfera izeneko zelula egitura tridimentsionalak lortzen dira. Esferoide hauek immunoeskasia daukaten saguetako nerbio ziatikoetan txeratu dira eta giza neurofibromen ezaugarriak dituzten tumoreak hazi dira, pNF-ak ikasteko eredu egokia denaren seinale (2. irudia).

2. irudia. pNF-ak ikertzeko 3D *NF1*(-/-) iPSC-en ereduaren eskema, (Mazuelas et al, 2022)-tik eraldatua.



Errepikapen Palindromiko Laburrak, Multzokatuak eta Tarteka Bateratuak (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*, CRISPR) bakterioen immunitate-sistema mota bat da. Bakterioei eraso egin dieten birusen DNA zatiak dituzten sekuentziak dira eta birusen eraso berrietan DNA detektatu eta suntsitzeko erabiltzen dituzte, haietatik eraginkortasunez defendatzeko. Gaur egun sistema hori moldatu eta ingenieritza genetikorako tresna bat bihurtu da, non oso espezifikoak diren edozein espezietako DNA-*locus*etan base-pareak gehitu eta ezaba ditzakeen. Gehien erabiltzen dena CRISPR-Cas9 da. Molekula hau zeluletara sartzeko sistema berriena erribonukleoproteinen (RNP) bideko transfekzioa da. Beste sistemekin (plasmidoak, mRNA eta birusak) konparatuz abantai ugari ditu: efizientzia altuagoa, zitotoxizitate baxuagoa, errazagoa zein azkarragoa, *off-target* efektu baxuagoa eta transfektatzen oso zailak diren zeluletan eraginkorra. Hau da, iPS zeluletan hiru gene tumore supresoreak editatzeko aparteko tresna da.

2.1 Ikerketaren helburua

Neurofibroma plexiforme batetik MPNST-a garatzeko inaktibatu behar diren hiru gene tumore supresoreen (*NF1*, *CDKN2A*, PRC2 (*SUZ12*)) funtzioen garrantzia ulertzea da helburua. Horretarako:

1) CRISPR-Cas9 teknologia erabiliz, hiru geneak editatutako induzituriko zelula ama pluripotenteen (iPSC) zelula-lerroak sortu.
2) Zelula lerroak Kresta Neuraleko (NC) ama zeluletara eta Schwann zeluletara (SC) ezberdindu eta geneen ekarpen tumorigenikoa *in vitro* (3D ereduan) zein *in vivo* (saguetan txertatuz) ebaluatu.
3) *In vitro* (3D eredua) farmako behaketa egitea.

3. Ikerketaren muina

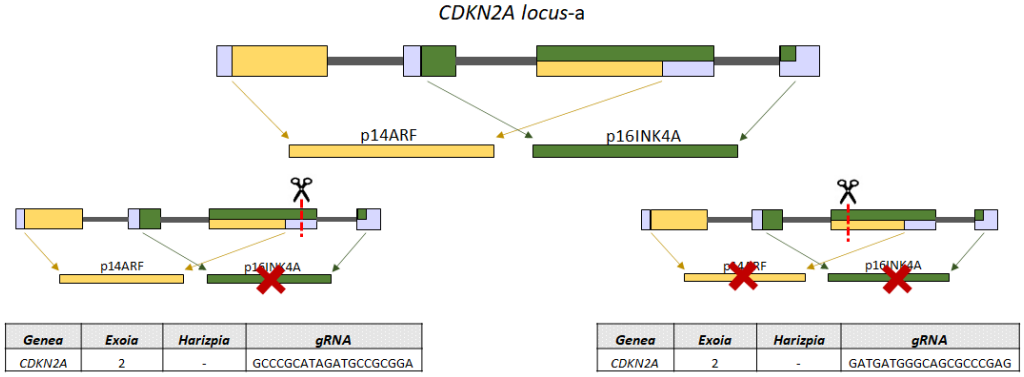
3.1 *NF1*(-/-) *CDKN2A*(-/-) zelula-lerroak

CDNK2A locus berezia daukan gene tumore supresorea da. Irakurketa patroi ezberdina daukaten bi proteina kodifikatzen ditu: p14ARF, p53 bidezidorrarekin eta zelularen apoptosi mekanismoarekin loturiko proteina da. Eta beste aldetik p16INK4A, erretinoblastoma bidezidorrarekin, ziklo zelularrarekin eta seneszentziarekin erlazionaturiko bidea (3A Irudia). Babes mekanismo hauen bidez, zelula ezin bada modu zuzen batean zatitu edota arriskuren bat nabaritzen badu, apoptosiaz (suizidio

zelularra) edota seneszentziaz (ziklo zelularraren etenaz) baliatzen da. Baina *CDKN2A* inaktibaturik badago, zelula akastunek etengabe zatitzen jarraitu dezakete.

Giza aNF-etan *CDKN2A locus*-a translokazioen bidez guztiz inaktibatzen da, hau da, p14ARF zein p16INK4A ez dira funtzionalak (Magallón-Lorenz et al, 2021). Hori frogatzeko, CRISPR-Cas9 bidez *NF1*(-/-) den iPS zeluletan bi proteinak kodifikatzen dituen sekuentzia eta soilik p16INK4A kodifikatzen duen sekuentzia editatu ditugu (3B Irudia).

3. irudia. *CDKN2A locus*-a editatzeko erabilitako estrategia. A) *CDKN2A locus*-ak kodifikatzen dituen bi proteinak: p14ARF eta p16INK4A. B) Editatutako sekuentzien kokalekua eta kasu bakoitzean erabilitako edizio-sekuentziak (gRNA).



Genea	Exoia	Harizpia	gRNA
CDKN2A	2	-	GCCCGCATAGATGCCGCGGA

Genea	Exoia	Harizpia	gRNA
CDKN2A	2	-	GATGATGGGCAGCGCCCGAG

Zelula bakarretik datozen iPS zelula editatuak lortzeko, GFP proteina fluoreszentea daukaten RNP konplexuak erabili dira. Transfektaturiko zelulak GFP positiboak dira, eta fluxu zitometriaren bidez RNP-a bereganatu duten zelulak banatu ditzakegu. Ondoren, diluzio limitea egiten da, eta 96 putzuetako plakak erabiliz, putzuko 2 zelula plakeatzen dira. Kolonia bakarra hazten diren putzuak anplifikatu egiten dira DNA lortzeko eta zelulak kriomantentzeko kantitate nahikoa izan arte. Azkenik, Sanger sekuentziazioa erabiliz, zelula klon bakoitzean dauden *CDKN2A* mutazioak detektatzen dira. Guztira 5 *NF1*(-/-) *CDKN2A*(-/-) lortu ditugu: 2 klon soilik *CDKN2A locus*-aren p16INK4A sekuentzia mutatuta daukatenak eta 3 *locus* osoa inaktibaturik daukatenak (1. taula).

1.taula. Lortutako *NF1*(-/-) *CDKN2A*(-/-) klonak, eta mutazioei dagokien informazioa.

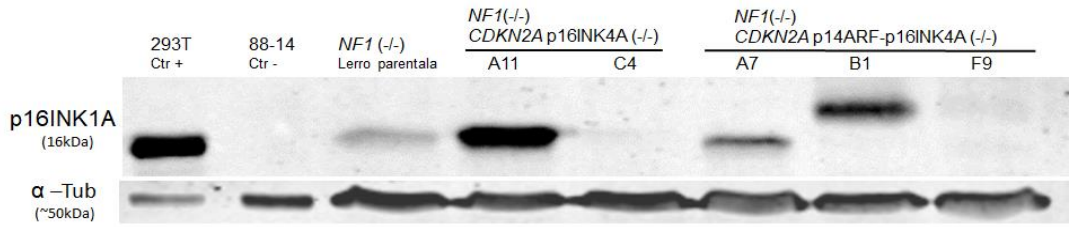
Klona	Aleloa	Mutazioa	Isoforma	cDNA
C4	1	Ins1	p16INK4A	c.473insC
	2	Ins1del2	p16INK4A	c.472delinsT+475del
A11	1	Del10	p16INK4A	c.472_481del
	2	Del85	p16INK4A	c.394_478del

Klona	Aleloa	Mutazioa	Isoforma	cDNA
A7	1	Del36	p16INK4A	c.187_222del
			p14ARF	c.261_296del
	2	Del8+ins4	p16INK4A	c.194_201del197TCAT
			p14ARF	c.268_275del271TCAT
B1	1	Del 19	p16INK4A	c. 194_212del
			p14ARF	c.268_287del
	2	Ins11	p16INK4A	c.203insATCATCATGGC
			p14ARF	c.276insATCATCATGGC
F9	1	Del 1	p16INK4A	c. 202del
			p14ARF	c. 276del
	2	Del 22	p16INK4A	c.194_215del
			p14ARF	c.268_289del

iPS-NC ezberdinketa

Immunozitokimika teknika erabiliz, 4/5 klon zelula pluripotenteek soilik adierazten dituzten markatzaileak (OCT3/4 eta Tra1-81) detektatzen ditugula egiaztatu dugu, hala, iPS zelulak izaten jarraitzen dute. Beste aldetik, NC zeluletara ezberdindu ditugu, eta NC leinuko zelulak direla egiaztatu da immunozitokimikaren bidez (SOX10 eta p75) eta fluxu zitometriaren bidez (p75 eta Hnk1). Western blot teknikaren bidez p16INK4A proteinaren adierazpenaren analisia egin da. DNA mutatua egon arren, kasu batzuetan aberrantea den proteina detektatzen da. Hala ere, *NF1*(-/-) *CDKN2A* p16INK4A(-/-) eta *NF1*(-/-) *CDKN2A* p14ARF-p16INK4A(-/-) lerro-zelular bana lortu ditugu, C4 eta F9 klonak hain zuzen ere (4 Irudia).

4. irudia. *NF1*(-/-) *CDKN2A*(-/-) klonetan p16INK4A proteinaren adierazpen-eza detektatzeko Western blot-a.



Bidezidor biokimikoekin erlazionaturiko hainbat entsegu funtzional egin dira *NF1*(-/-) zelula-lerro parentalarekin konparatuz. Baina ziklo zelularrari, zatitze-tasari, migrazioari edota seneszentziari dagokionez, *in vitro*, ez dira ezberdintasun estatistiko bereizgarririk aurkitu.

3.2 *NF1*(-/-) *CDKN2A*(-/-) *SUZ12*(-/-) zelula-lerroak

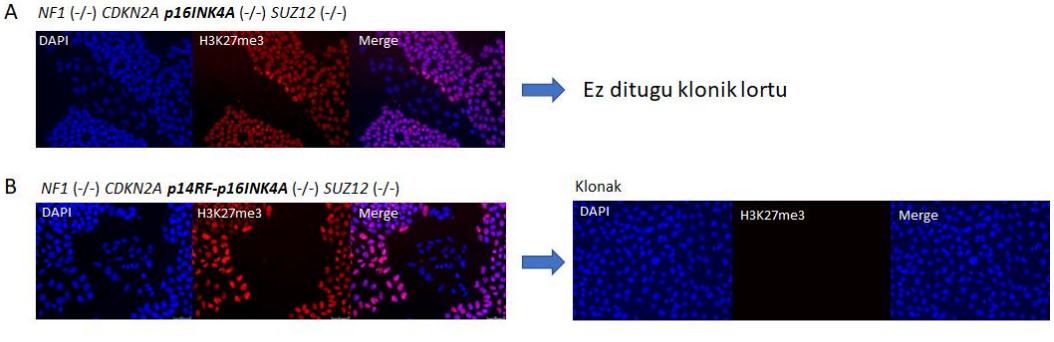
SUZ12 gene tumore supresorea polycom II konplexu errepresiboa (PRC2) osatzen duen molekuletako bat da. Konplexu honen funtziorik garrantzitsuenetarikoa H3K27 histona trimetilatzea da. Honela, metilatutako DNA zonaldeak ezin dira transkribatu, hau da, geneen adierazpena erreprimitua mantentzen du. MPNST-en ehuneko oso altu batean *SUZ12* edo *EED* geneak inaktibaturik daude. Beraz, hautaturiko *NF1*(-/-) *CDKN2A*(-/-) iPS zelula lerroetan *SUZ12* genea editatu dugu, RNP CRISPR-Cas9 teknologia erabiliz.

Kasu honetan, H3K27me3 detektatzeko antigorputz ona dagoenez, RNP konplexuen bidez transfektaturiko GFP positiboak diren zelulak fluxu zitrometiaren bidez banatu ondoren immunozitokimika teknika erabili dugu editatutako zelulak identifikatzeko (5A Irudia). Ondoren, anplifikazio prozesuan entsegu funtzionala errepikatu egiten dugu soilik H3K27me3 negatiboak diren zelulak anplifikatzen jarraitzeko eta aurrerago Sanger sekuentziazioaren bidez mutazioak identifikatzeko.

Mutazioen ordenaren garrantzia: *NF1*, *CDKN2A* eta *SUZ12*

Hautatutako bi *NF1*(-/-) *CDKN2A*(-/-) iPS zelulak editatzea lortu dugu, baina anplifikatzerakoan p14ARF aktibo daukan klona zatitzeari uzten dio (5A. Irudia). *NF1*(-/-) *CDKN2A* p14ARF-p16INK4A(-/-) *SUZ12*(-/-) kasuan, ordea, hiru klon lortu ditugu (5B. irudia). Hau da, *CDKN2A* geneak kodifikatzen dituen bi proteinak inaktiboak izan behar dira MPNST-a garatzeko.

5. irudia. Hautaturiko bi klonen *SUZ12* edizioa, detekzioa eta lortutako *NF1*(-/-) *CDKN2A*(-/-) *SUZ12*(-/-) klonen mutazioen informazioa. A) *NF1*(-/-) *CDKN2A* p16INK4A(-/-) GFP positiboak diren H3K27me3-rako immunozitokimika, non *SUZ12* (-/-) zelulak antzeman ditzakegun, baina ez ditugu klonik lortu. B) *NF1*(-/-) *CDKN2A* p14ARF-p16INK4A(-/-) GFP positiboak diren H3K27me3-rarko immunozitokimika, lortu ditugun klonak eta mutazioen informazioa.



Genea	Exoia	Harizpia	gRNA
SUZ12	1	-	GCCGAAAATGGAGCACGTCC

Klona	Aleloa	Mutazioa	cDNA
F9C6	1	Del2	c.474_475del
	2	Del10	c.476_485del

Genea	Exoia	Harizpia	gRNA
SUZ12	10	-	CGAAGAGTGAACTGCAACGT

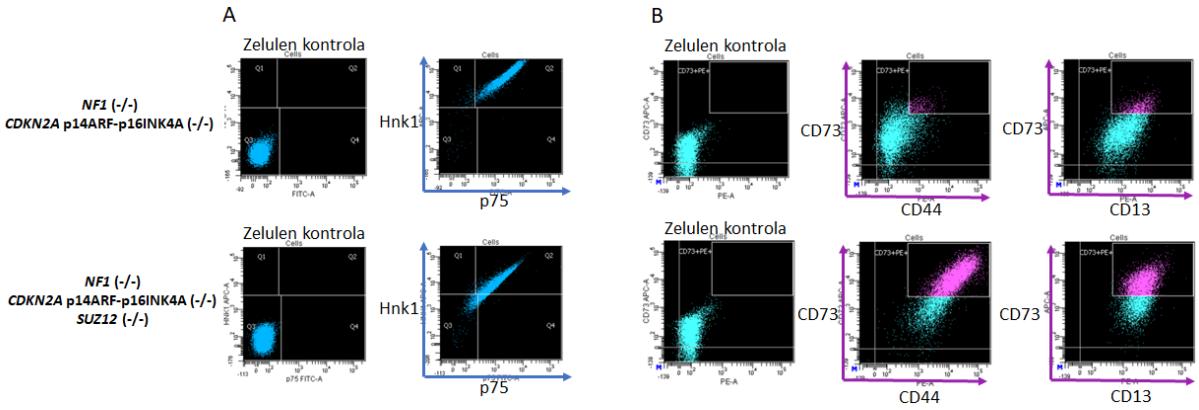
Klona	Aleloa	Mutazioa	cDNA
F9H8	1	Del6	c.1236_1241del
	2	Del18	c.1229_1247del
F9D8	1	Del21Ins4	c. 1216_1236delinsCCTG
	2	Ins11	c.1236insCACTCTTCGTT

SUZ12 edizioaren ondorengo iPS zelulen ezberdintze espontaneoa eta zelula mesenkimalen nortasunaren eskuraketa

Beste aldetik, klon hauek anplifikatzen goazen heinean, iPS zelulen morfologia galtzen doaz, hau da, pluripotenteak izateari uzten diote espontaneoki ezberditzen direlako. Zelulak iPS baldintzetan kultibatzen jarraituz, morfologia mesenkimala eskuratzen dute, eta azkenean zatitzeari uzten diote. Editaturik dauden zelulak *in vitro* mantentzeko, edizioaren ondoren NC baldintzetan kultibatzen ditugu, eta kultibo homogeneoak eta egonkorrak lortu ditugu.

Hiru zelula-lerro berri hauek karakterizatzeko, alde batetik, NC leinuko markatzaileak (p75 eta Hnk1) fluxu zitometria teknikaren bidez aztertu ditugu. Lerro parentalarekin konparatuz, patroia pixka bat ezberdina izan arren, zelula gehienek bi molekulak adierazten dituzte (6A Irudia). Beste aldetik, morfologia mesenkimala izateko joera ikusita, zelula ama mesenkimalen (MSC) markatzaile batzuk (CD73, CD44 eta CD13) aztertu ditugu teknika berdina erabiliz. *NF1*(-/-) *CDKN2A* p16INK4A(-/-) zelula lerro parentalak ia ez ditu molekula hauek adierazten, baina *NF1*(-/-) *CDKN2A*(-/-) *SUZ12*(-/-) zelula gehienak mesenkimalen bereizgarriak diren hiru molekulak ere adierazten dituzte (6B. irudia).

6. irudia. *NF1*(-/-) *CDKN2A*(-/-) eta *NF1*(-/-) *CDKN2A*(-/-) *SUZ12*(-/-) zelula-lerro bakoitzeko fluxu zitometriaren bidezko karakterizazioa. A) NC leinuko Hnk1 eta p75 markatzaileen adierazpena. B) MSC-en CD73, CD44, eta CD13 markatzaileen adierazpena.

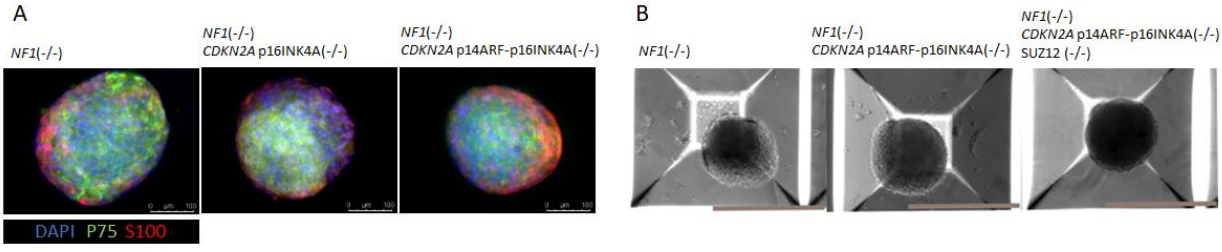


3.3 3D ereduak

pNF-ek eta aNF-ek antzekotasun ugari dituzte: fibroblastoen portzentaia, zelulen nortasuna… Horregatik, *NF1* (-/-) *CDKN2A* (-/-) zelula lerroen kasuan, pNF-aren 3D ereduan erabilitako protokoloa aplikatu da. NC zelulak SC zeluletara 2D plaketan ezberdintzen hasten dira, eta 5. egunean mikroputzuak dituzten Aggrewell™ plaketara pasatzen dira pNF-etatik eratorriko fibroblastoekin batera. Azkenean, 15. egunean immunozitokimika teknika erabiltzen da egindako NC-SC leinuko markatzaileen bidez karakterizatzeko. *NF1*(-/-) zelulen kasuan bezala, *NF1*(-/-) *CDKN2A*(-/-) hautagaietan ere esferoideak lortu ditugu (7A. irudia).

MPNST-en 3D eredua lortzeko, protokoloan aldaketa batzuk egin dira. Alde batetik, MPNST errealetan oso fibroblasto gutxi daudenez, kultibo sinpleak egin ditugu. Beste alde batetik, *NF1*(-/-) *CDKN2A* (-/-) *SUZ12*(-/-) zelula lerroek MPNSTak bezala NC-MSC nortasuna dutenez, mikroputzuak dituzten Aggrewell™ plaketan kultibatu ditugu 2D-n erabiltzen den medio berdina erabiliz. (7B. Irudia).

7. irudia. 3D ereduak. A) pNF ereduko protokoloa jarraituz sortutako esferen immunozitokimika bidezko karakterizazioa NC-SC leinuko markatzaileekin (p75 eta S100). B) Aggrewell™ plaketako mikroputzuetan sortutako esferak.



4. Ondorioak

CRISPR-Cas9 teknologia erabiliz, *CDKN2A* genearen *locus* osoa (p14ARF zein p16INK4A) *NF1*(-/-) genotipoa daukaten iPS zeluletan editatzea lortu dugu, eta guztira 5 klon lortu ditugu. Guztiak NC zelula multipotenteetara zuzenki ezberdindu ditugu, eta morfologiari zein adierazpenari dagokionez, *NF1*(-/-) zelula-lerroarekin konparatuz, ez dago ezberdintasunik. Klon guztietatik, p16INK4A proteina detektagarria ez den *NF1*(-/-) *CDKN2A* p16INK4A(-/-) zelula-lerro bat eta *NF1*(-/-) *CDKN2A* p14ARF-p16INK4A(-/-) beste bat lortu ditugu. Egin diren entsegu funtzionaletatik (zatitze-tasa, ziklo zelularra, seneszentzia…), *NF1*(-/-) zelula-lerroarekin konparatuta, ez daude ezberdintasun estatistiko bereizgarririk. Gainera, pNF 3D ereduaren neurofibromaesferen protokoloa jarraituz, editaturiko zelula-lerro hauekin esferak sortu daitezke.

Hiru gene tumore supresoreen inaktibazioak, eta hauen orden espezifikoak (*NF1*-*CDKN2A*-PRC2) MPNST-en garapen prozesuan garrantzi handia dute. Gainera, MPNST-en genoma sakonki ikertu den kasuetan, *CDKN2A locus*-a guztiz inaktibatuta aurkitzen da translokazio baten ondorioz. Kasu errealetan bezala, guk laborategian soilik *NF1*(-/-) *CDKN2A* p14ARF-p16INK4A(-/-) *SUZ12*(-/-) iPS klonak lortu ditugu. P14ARF proteina funtzionala daukan zelula-lerroa editatzea lortzen badugu ere, klonak anplifikatzen goazen heinean, zatitzeari uzten diote. Hau da, neurofibroma atipikotik ezin da MPNST-a garatu *CDKN2A* genea guztiz inaktibaturik ez badago. Gainera, gene tumore supresoreen ordena (*NF1*-*CDKN2A*-PRC2) zentzu biologikoa daukala frogatzen dugu.

Beste alde batetik, pNF-ak eta aNF-ak osatzen dituzten zelulek NC-SC nortasuna daukate. MPNST-ak osatzen dituzten zelulek ordea, nortasun mesenkimala daukate. *SUZ12* genea guk sortutako iPS zeluletan editatzerakoan, gaitasun pluripotentea galdu eta espontaneoki ezberdintzen dira. Kasu guztietan, NC leinuko markatzaileak (p75 eta HNK1) zein MSC leinuko markatzaileak (CD73, CD44 eta CD13) adierazten dituzte. Nortasun mesenkimalaren zergatia PRC2-aren funtzioa galtzearen ondorioa dela frogatzen dugu.

5. Etorkizunerako planteatzen den norabidea

MPNST-ak osatzen dituzten zelulen ezaugarri bereizgarrienetariko bat berrantolaturiko genoma konplexuak dira. Laborategian sortutako *NF1*(-/-) *CDKN2A*(-/-) *SUZ12*(-/-) zelula-lerroek ez daukate ezaugarri hori. Hiru gene tumore supresoreen edizioa ezegonkortasun genomikoa sortzeko nahikoa den ikertzeko, zelula-lerroak zahartuko ditugu bi hilabeteetan zehar etengabe kultibatuz eta aldaketa morfologikoak edota zatitze-tasan ezberdintasunak dauden ala ez frogatuz.

Beste aldetik, sortutako *NF1*(-/-) *CDKN2A*(-/-) *SUZ12*(-/-) zelulen nortasuna sakonago ikertzen dihardugu. Horretarako, zelulen adierazpenari, epigenetika eta kromatinaren egoerari buruz informazio gehiago ematen dizkiguten teknikak erabiliko ditugu. Modu honetan, tumore bakoitzak (pNF, aNF eta MPNST) errepresentatzen dituen genotipo zehatzeko zelula-lerroak beraien artean konparatuko ditugu hiru gene supresoreen edizioek nola eragiten duten ulertzeko.

Sortutako zelula-lerroek *in vivo* tumoreak sortzeko gaitasuna duten ikertu nahi dugu. Horretarako, pNF-ak ikertzeko dagoen 3D iPS zelulen eredua zein hiru geneak editatuta dauzkaten zelula-lerroentzako moldaturiko eredua aplikatuko dugu, eta immunoeskasia daukaten saguen nerbio ziatikoan txertatuko ditugu. Modu honetan *NF1*(-/-) *CDKN2A*(-/-) zelula lerroetatik aNF-ak lortzen badira eta *NF1*(-/-) *CDKN2A*(-/-) *SUZ12*(-/-) zelula lerroetatik MPNST-ak hazten badira, bi tumore hauek ikertzeko *in vitro*-*in vivo* ereduak lortuko ditugu.

Azkenik, MPNST-ak garatzen dituzten gaixoentzat tratamenduren bat aurkitzeko lehenengo pausoak eman nahi ditugu. Horretarako hiru gene tumore supresoreetako bidezidorretan eragina daukaten farmakoak frogatuko ditugu 3D ereduan: *NF1*-arekin erlazionaturiko MEKi, CDK4/6i *CDKN2A* inaktibaturiko zelula-lerroetan, eta BETi edo farmako epigenetikoak PRC2 funtzionala ez den kasuetan.

6. Erreferentziak

Carrió, M, Mazuelas, H, Richaud-Patin, Y, Gel, B, Terribas, E, Rosas, I, Jimenez-Delgado, S, Biayna, J, Vendredy, L, Blanco, I, E Castellanos, E, Lázaro, C, Raya, A & Serra E (2019). Reprogramming captures the genetic

and tumorigenic properties of Neurofibromatosis Type1 plexiform neurofibromas. *Stem cell Reports 2019 12-3*, pp.639-64 https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2019.01.001

Evans, DGR, Baser, ME, McGaughran, J, Sharif, S, Howard, E & Moran,A (2002). Malignant peripheral nerve sheath tumours in neurofibromatosis 1. *J Med Genet 39*, 311-314. https://doi.org/10.1136/jmg.39.5.311

Magallón-Lorenz, M, Fernández-Rodríguez, J, Terribas, E, Creus-Batchiller, E, Romagosa, C, Estival, A, Perez Sidelnikova, D, Salvador, H, Villanueva, A, Blanco, I, Carrió, M, Lázaro, C, Serra, E & Gel, B (2021). Chromosomal translocations inactivating CDKN2A support a single path for malignant peripheral nerve sheath tumor initiation. *Hum Genet.Aug;140(8):*1241-1252.https://doi.org/10.1007/s00439-021-02296-x

Magallón-Lorenz, M, Terribas, E, Ortega-Bertran, S, Creus-Bachiller, E, Fernádez, M, Requena, G, Rosas, I, Mazuelas, H, Uriarte-Arrazola, I, Negro, A, Lausova, T, Castellanos, E, Blanco, I, DeVries, G, Kawashima, H, Legius, E, Brems, H, Mautner, V, Kluwe, L, Ratner, N, Wallace, M, Fernández-Rodriguez, J, Lázaro, C, A. Fletcher, J, Reuss, D, Carrió, M, Gel, B & Serra E (2023). Deep genomic analysis of malignant peripheral nerve sheath tumor cell lines challenges current malignant peripheral nerve sheath tumor diagnosis. *iScience 26, 106096***.** https://doi.org/10.1016/j.isci.2023.106096

Mazuelas, H, Magallón-Lorenz, M, Fernández-Rodríguez, J, Uriarte-Arrazola, I, Richaud-Patin, Y, Terribas, E, Villanueva, A, Castellanos, E, Blanco, I, Raya, Á, Chojnacki, J, Heyn, H, Romagosa, C, Lázaro, C, Gel, B, Carrió, M & Serra, E (2022). Modeling iPSC-derived human neurofibroma-like tumors in mice uncovers the heterogeneity of Schwann cells within plexiform neurofibromas. *Cell Rep. 15;38(7):110385.* https://doi.org/10.1016/j.celrep.2022.110385

Miettinen, MM, Antonescu, CR., Fletcher, CDM., Kim, A, Lazar, AJ, Quezado, MM, Reilly, KM, Stemmer-Rachamimov, A, Stewart, DR, Viskochil, D, Widemann, B & Perry, A (2017). Histopathologic evaluation of atypical neurofibromatous tumors and their transformation into malignant peripheral nerve sheath tumor in patients with neurofibromatosis 1-a consensus overview. *Hum Pathol 67*, 1–10. https://doi.org/10.1016/j.humpath.2017.05.010

Zhang, X, Murray, B, Mo, G Shern, JF (2020). The role of Polycomb Represive Complex in Malingnat Peripheral Nerve Sheath Tumor. *Genes (Basel). 11(3):*287. https://doi.org/10.3390/genes11030287

7. Eskerrak eta oharrak

Eskerrak eman nahi diot Tv3 Maratoia fundazioari, proiektu hau (51/C/2019) finantziatzeagatik eta Carlos III Osasun Institutoari (ISCIII), PFIS dirulaguntzarekin doktoretza egitea posible zaidalako. Ehunak eta tumoreak dohaintzan eman dizkiguten gaixo guztiei, *Afectados de Neurofibromatosis* asoziazioari eta AcNefi-ri, gure ikerketei eskainitako laguntzagatik eta euskarria izateagatik. IGTP-ko Zitometria plataformari, bereziki Gerard Requerari, fluxu zitometrian lortutako informazio guztia ondo prozesatzeko eta irudikatzeko eskainitako laguntzagatik. Proiektu honetan parte hartzen ari diren kolaboratzaile gutiei. Nire taldeari, Minbizi Hereditarioaren IGTP-ko taldeari, proiektu honetan eman diren aurrerapauso guztiak taldean egindako lan gogorraren ondorioa direlako. Batez ere, taldeko Helena Mazuelas doktoreari, lankide eta lagun paregabea izateagatik, laborategiko teknika ugari irakasteagatik eta bere doktoretzan pNF-ak ikasteko *NF1*(-/-) iPSC eredua sortzeagatik. Eta azkenik, Eduard Serra eta Meritxell Carrió doktoreei, doktoretza ezin hobeto zuzentzeagatik eta edozein arazoren aurrean laguntza eskaintzeagatik.

Leishmaniasia: gaixotasun globala. Tratamendurako hautagai berriak

Itziar De-Miguel[1*], Aroia Burguete-Mikeo[1*], Rima El-Dirany[1,2], José Peña-Guerrero[1], Celia Fernández-Rubio[1], Paul Nguewa[1]

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

[2]Biologia Molekularreko eta Minbiziaren Immunologiako Laborategia, Zientzia Fakultatea I, Libanoko Unibertsitatea, Hadath 1003, Libano

**Egile hauek era berean parte hartu dute lan honetan*

idemiguel.1@alumni.unav.es

Laburpena

Leishmaniasia hedatzen ari da Europan, eta tratamendu nagusiek hainbat desabantaila dituzte. Lan honek bi alderdi horiek jorratu nahi ditu. *Leishmania infantum* espezieko parasitoak isolatu eta identifikatu dira, leishmaniasiaz jotako Nafarroako txakur baten gongoil linfatikoaren lagin batetik abiatuta. R38 eta R38-P konposatuen jarduera leishmanizida aztertu da. R38 konposatua interesgarria suertatu zen, makrofagoen infekzio ehunekoa murrizteko gaitasun handiagatik.

Hitz gakoak: leishmaniasia, tratamenduak, makrofagoak, amastigoteak, promastigoteak, Nafarroa

Abstract

Leishmaniasis is spreading in Europe and the main treatments available exhibit several disadvantages. This paper aims to address these two aspects. Leishmania infantum parasites have been isolated and identified from a lymph node sample obtained from a dog with leishmaniasis in Navarra. The leishmanicidal activity of the compounds R38 and R38-P has been studied. Compound R38 is a promising drug against leishmaniasis due to its ability to reduce the percentage of infected macrophages.

Keywords: leishmaniasis, treatments, macrophages, amastigotes, promastigotes, Navarre

1. Sarrera eta motibazioa

Leishmaniasia flebotomo emeek transmititutako eta *Leishmania* generoko parasito protozoarioek eragindako gaixotasun talde bat da. Gaur egun, leishmaniasia osasun-arazo garrantzitsua da herrialde tropikal askotan eta mundu osoan duen hedapena gero eta nabarmenagoa da. 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 (Alvar et al., 2012; Ruiz-Postigo et al., 2020; Sundar eta Rai, 2002).

Ornogabeetan, leishmaniek forma flagelatua aurkezten dute (promastigoteak) eta flebotomoen digestio-traktuan garatzen dira. Ostalari ornodunetan, aldiz, forma aflagelatua dute (amastigoteak) (Sesma eta Barricarte, 1997). Transmisio-zikloa flebotomo eme batek kutsatutako ornodun baten (batez ere txakurrak eta gizakiak) odola xurgatzen duenean hasten da (Osasun Publikoko Zuzendaritza Nagusia, 2018). 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 (Alvar et al., 2012; Ruiz-Postigo et al., 2020; Sundar eta Rai, 2002).

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 (Fernández Martínez et al., 2019).

2015ean leishmaniasia Espainian nahitaez aitortu beharreko gaixotasun gisa sailkatu bazen ere autonomia-erkidego guztientzat, deklarazio falta garrantzitsua susmatzen da, % 25-40koa

leishmaniasi biszeralaren kasuan eta ia % 100ekoa larruazaleko leishmaniasian (Osasun Publikoko Zuzendaritza Nagusia, 2018). Euskal Herriari dagokionez, 1998-2021 denboraldian, giza leishmaniasiaren 65 kasu baina gehiago deskribatu dira, adin guztietako pertsonetan, eta zenbait kasutan GIB/HIESaren (Giza Inmunoeskasiaren Birusa/Hartutako Inmunoeskasiaren Sindromea) koinfekzioarekin lotuta. Kasu horietako hogeita bederatzi Nafarroan jakinarazi ziren eta hogeita hamasei Euskadin. Ipar Euskal Herriari buruzko informaziorik ez da lortu (Nafarroako Osasun Publikoko Buletinak eta Euskal Autonomia Erkidegoko Buletin epidemiologikoak, 1998-2021).

Gizakiez gain, txakurrak dira Europako kontinentean gaixotasuna pairatzen duten izaki nagusiak. Infektatutako txakurren % 60a asintomatikoa dela kalkulatzen da (Amela et al., 2012) eta, gaixotasunaren transmisioan duten paper aktiboa dela eta (Molina et al., 1994), funtsezkoa da animalia hauetan egoera epidemiologikoa ezagutzea.

Orain arte, Euskal Herrian txakurren leishmaniasiari buruz egindako ikerketak urriak dira. Euskadin, txakurren % 5 kutsatuta dago (Gálvez et al., 2020), eta Nafarroan, aldiz, prebalentzia % 6-18koa da (Díaz-Regañón et al., 2020; Gálvez et al., 2020; Sesma eta Barricarte, 1997). Proiektu honetan, diziplina anitzeko talde batek (farmazialariak, albaitariak, biologoak, kimikariak…) gaitzaren alderdi hau jorratzen du.

Leishmaniasiaren aurkako tratamenduak egon arren, (van Griensven eta Diro, 2019; Mcgwire eta Satoskar, 2014) hala nola, antimonial pentabalenteak, B anfoterizina, paromomizina eta miltefosina, (Leishmaniasiaren kontrola: OMEko Adituen Batzordeak Leishmaniasiaren Kontrolari buruz egindako bilera baten txostena, 2010) guztiek desabantaila ugari dituzte, horien artean, kostu ekonomiko handia, toxikotasuna, administratzeko zailtasuna, erresistentzien agerpena eta teratogenizitatea (Oliveira et al., 2011; Wortmann et al., 2010).

Horregatik, egungo erronketako bat da tratamendu aktibo, seguru eta eskuragarri berriak aurkitzea da (Fernández-Rubio et al., 2019; Vacas et al., 2020). Ikerketa-bide desberdinen artean, nabarmentzekoak dira peptido antimikrobianoak (El-Dirany et al., 2021, 2022; Mwangi et al., 2019), pisu molekular txikiko oinarri peptidikoa duten molekulak eta organismo guztiek sortuak (ugaztunak, ornodunak, ornogabeak, landareak, onddoak eta bakterioak) (Pasupuleti et al., 2012). Sortzetiko immunitate-sistema modulatzeko gaitasuna dutela frogatu da, baita patogenoen aurkako aktibitatea, toxikotasun baxua eta erresistentzien sorrera urria ere (Robles-Loaiza et al., 2021).

Lan hau R38 peptido antimikrobiarraren eta R38-P konposatuaren aktibitate leishmanizidaren azterketan oinarritu da. R38-P konposatua, R38 pisu molekular handiko proteina bakteriano batekin elkartzearen emaitza da. Azken hori ibilgailu gisa erabiltzen da, R38ren ekintza-lekurako garraioa errazteko.

2. Arloko egoera eta ikerketaren helburuak

Leishmaniasi kasuen kopuruak gora egin du azkeneko hamarkadan Europan, batez ere, Italia eta Espainia bezalako herrialde endemikoetan. Zenbait adituk, leishmaniasia gaixotasun emergentea konsideratzen dute (Herrador et al., 2015; Ready, 2010). Hori dela eta, ezinbestekoa da haren bilakaera modu globalean aztertzea, eskuhartzen duten alderdi guztiak kontuan hartuz: agente patogenoak, bektorea, ingurumena eta erreserborioak.

Era berean, OMEk egungo erronketako bat bezala ezarri du tratamendu berriak bilatzea eta garatzea (Control de las leishmaniasis, 2010).

Lan honek behar horiei erantzun nahi die, honako helburu hauek planteatuz:

- Albaitariekin lankidetzan, Nafarroako txakurretan leishmaniasia ikertu.
- Foru erkidegoko txakurretatik *Leishmania* parasitoak isolatu eta identifikatu.
- Konposatu berrien jarduera leishmanizida aztertzea, R38 eta R38-P barne.

3. Ikerketaren muina

3.1 Nafarroan diziplina anitzeko lantalde bat eratu.

Lehenik eta behin, Nafarroako Albaitarien Elkargo Ofizialarekin (COVETNA) batera gaixotasunaren egoera Foru Erkidegoan aztertu zen, baita profesionalen beharrak eta hainbat albaitaritza klinikarekin lantalde bat osatzeko aukera ere.

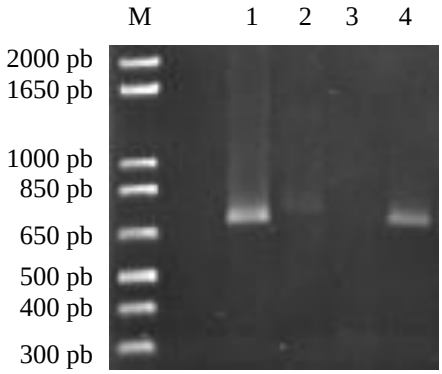
Gaixotasunarekin esperientzia duten kliniken lankidetza eskatu ondoren eta Nafarroako zonalde guztiak biltzen saiatuz, bost kliniken kolaborazioa lortu zen.

3.2 Parasitoen isolatzea eta identifikazioa

Klinika batetik leishmaniasia zuen txakur baten gongoil linfatikoaren lagin bat jaso zen, eta Schneider's Drosophila ingurunean erein zen, % 20ko HIFBSz (behi-serum fetal inaktibatua) eta % 0,5eko penizilina-estreptomizinaz 10.000 U/ml (Gibco, AEB) osatua parasitoen isolamendua eta hazkundea errazteko. Ondoren, DNA eskuratu zen Medina-Acostak (Medina-Acosta eta Cross, 1993) deskribatutako metodoa jarraituz, ondoren, espeziea identifikatzeko.

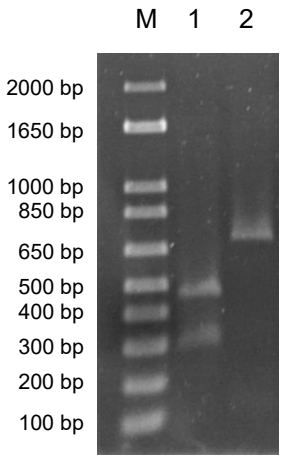
Identifikazioa PCR (polimerasaren kate-erreakzioa) bidez egin zen. *L. donovani* konplexuko *CPB* genea anplifikatzeko oligonukleotido espezifikoak hautatu ziren. Konplexu hau *Leishmania donovani* (*L. donovani*) eta *Leishmania infantum (L. infantum)* espeziek osatzen dute (azken hau gaixotasunaren erantzulea Espainian). PCR produktuak agarosa-geleko elektroforesi bidez ikusi ziren. 1. irudian lortutako emaitzak erakusten dira.

1. Irudia: PCR bidezko *CPB* genearen anplifikazioa. M: 1kb plus Ladder markadorea. 1: *L. infantum* kontrol positiboa. 2: *L. donovani kontrol positiboa*. 3: *Leishmania guyanensis kontrol negatiboa*. 4: Lagina.



Agarosa gela ikusi eta gero, laginak *L. donovani* konplexuko parasitoak zituela konfirmatu zen. Isolatutako parasitoen espeziea *L. infantum* zela baieztatzeko, PCR produktuak digeritu ziren DRAIII errestrikzio entzimarekin. Entzima honen diana *L. donovani*-ren *CPB* genean soilik aurkitzen da, ondorioz, bi banda sortuz (2. Irudia).

2. Irudia. PCR produktuen digestioa DRAIII errestrikzio entzimarekin. M: 1kb plus Ladder markadorea. 1: *L. donovani* kontrol positiboa. 2: Lagina.



Kontrol positibo gisa erabilitako *L. donovani*-ren digestioan 2 banda ikus daitezke, laginean aldiz, soilik bat. Honela, laginaren PCR produktua digeritu ez zenez, laginean *L. infantum* parasitoak zeudela egiaztatu zen.

3.3 Konposatu berrien jarduera leishmanizida *L.major* promastigoteen aurrean

R38 eta R38-P konposatuen ekintza leishmanizida aztertu zen. Horretarako, *Leishmania major (L. major*) espezieko parasito promastigoteak erabili ziren (laborategietan asko erabiltzen den espeziea). M199 (1x) ingurunean hazi ziren, HEPES (azido 2-[4-(2-hidroxietil)piperazin-1-il]etanosulfonikoa) 25 mM, sodio bikarbonatoa 20,8 mM (pH 6,80), % 10 HIFBS, % 4 HEPES 1 M (pH 7,40), adenina (% 1 adenina 10 mM, HEPES 50 mM), % 0,5 penizilina-estreptomizina 10.000 U/ml (Gibco, AEB), % 0,25 hemina % 50 trietanolaminarekin (% 0,20), % 0,4 biopterina 0,25 mg/ml eta % 0,10 biotinaz (% 0,1 biotina eta % 95 etanola) osatua. Parasitoak 96 platertxoko plaketan erein ziren, gero eta konposatu-kontzentrazio handiagoarekin batera, 26ºC-tan, 48 orduz. R38 konposatuarekin bost kontzentrazio desberdin probatu ziren, 10, 15, 20, 30 eta 40 µM. R38-Parekin berriz, sei kontzentrazio erabili ziren, 2, 4 ,8 ,32 ,64 eta 128 µM. Ondoren, MTT metodoarekin (3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazolio bromuro), konposatuen EC_{50} balioak zehaztu ziren (hazkundearen % 50 inhibitzen duen kontzentrazioa).

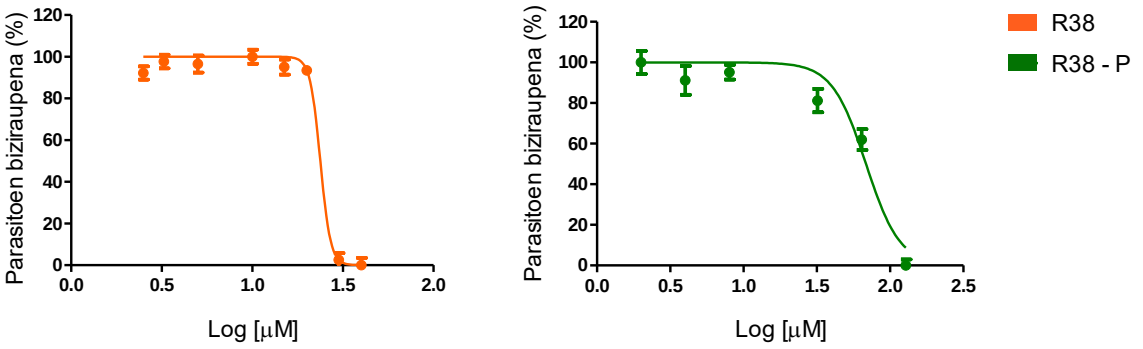
1. taulak R38 eta R38-P konposatuen MTT bidez lortutako EC_{50} balioak jasotzen ditu, *L. major* promastigoteen aurrean.

1. Taula. R38 eta R38-P konposatuen EC_{50}, *L. major* promastigoteen aurrean

Konposatua	EC_{50} ± SD (µM)
R38	22,6 ± 1,6
R38-P	> 65

Emaitza horiek grafikoki irudikatu ziren dosi-erantzun kurba bat jarraituz (3. irudia).

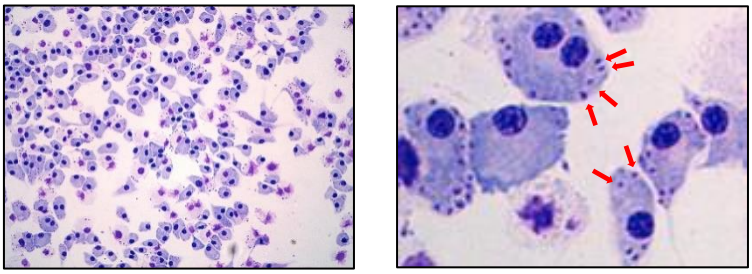
3. Irudia. *Leishmania major* espeziearen aurrean R38 eta R38-P konposatuen jardueraren dosi-erantzun kurbak



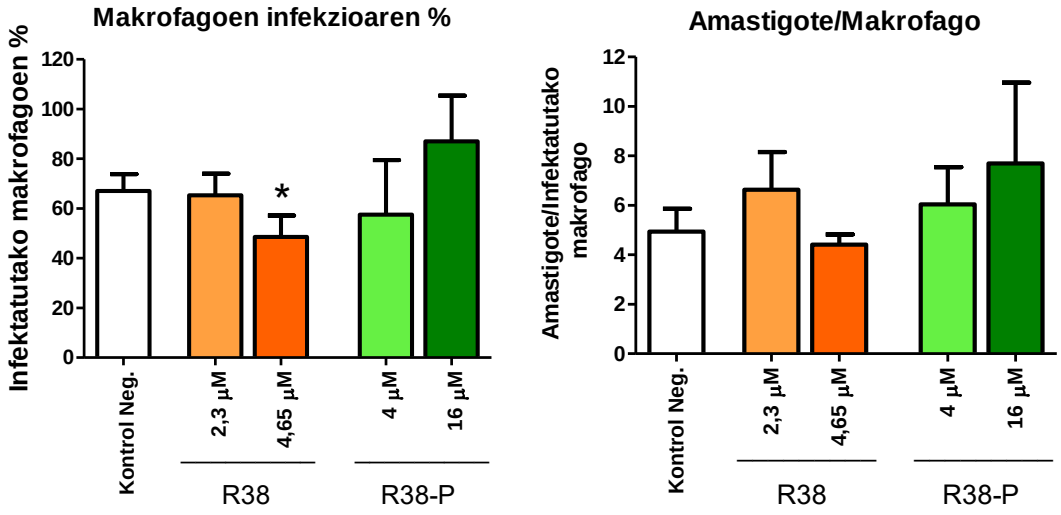
3.4 Konposatuen jarduera *Leishmania major* amastigoteen aurrean

Konposatuek amastigoteetan, hau da, parasitoen zelula barneko formetan, duten eragina ere aztertu zen. Horretarako, makrofago peritonealak erabili ziren. Makrofagoak DMEM (Gibco, AEB) ingurune osatuan erein ziren, parasitoekin batera, 1:20eko proportzioan (20 parasito makrofago bakoitzeko), eta 24 orduz inkubatu ziren 37ºC-tan. Makrofagoak infektatu ondoren, hautatutako konposatuekin tratatu ziren (R38 eta R38-P) eta 37ºC-tan eta % 5eko CO_2-an inkubatu ziren. R38 konposatuarekin bi kontzentrazio desberdin probatu ziren, 12,3 eta 4,65 µM. R38-Parekin berriz, 4 eta 16 µM. 24 orduko tratamenduaren ondoren, mikroskopio optiko bidezko kontaketaren bidez (4.irudia), makrofagoen infekzioaren ehunekoa eta makrofago bakoitzeko amastigoteen ratioa zehaztu ziren. 5. irudian, lortutako emaitzak agertzen dira.

4. Irudia. Mikroskopio optikoz hartutako irudia. *Leishmania major* amastigoteekin infektatutako makrofagoak.



5. Irudia. R38 eta R38-P konposatuen jarduera *Leishmania major* amastigoteetan. Infektatutako makrofagoen ehunekoa eta makrofago bakoitzeko amastigoteen kopurua



R38 konposatuak nabarmen murriztu zuen infektatutako makrofagoen ehunekoa % 67tik (kontrol negatiboa) % 48ra, 4,65 µMeko kontzentrazioan. 20 µM baino kontzentrazio txikiagoetan, R38-Pk ez zuen jarduerarik izan amastigoteen aurrean.

4. Ondorioak

Lehenik eta behin, diziplina anitzeko lantalde bat eratu da diagnostikatutako leishmaniasi-kasuak aztertzeko eta gaixotasunaren erantzule diren parasitoak isolatzen saiatzeko. Ondoren, espeziea identifikatu eta ezaugarriak zehazteko.

Lankidetza horiei esker, Nafarroan *Leishmania* parasito autoktonoak isolatu dira lehen aldiz, eta espeziea *Leishmania infantum* zela baieztatu zen.

Bestalde, R38 eta R38-P konposatu berrien jardueraren aurretiazko azterketak ondorioztatu zuen R38 konposatuak jarduera leishmanizida duela, makrofagoen infekzioaren ehunekoa nabarmen murriztuz. R38-P konposatuak, dirudienez, ez du emaitza sendorik 20 µM baino kontzentrazio baxuagoetan. Aurretiazko azterketa izanik, honako hau konfirmatzeko, kontzentrazio gehiago frogatzea beharrezkoa da.

5. Etorkizunerako planteatzen den norabidea

- Albaitariekin lankidetza mantendu.
- Nafarroatik datozen laginak isolatzen eta ezaugarritzen jarraitu, proiektua Euskal Herriko zonalde gehiagotara zabaltzeko aukerarekin.
- Konposatuen jarduera terapeutikoaren azterketekin jarraitu.
- R38 eta R38-P konposatuen jarduera zehaztu lortutako laginaren (*L. infantum*) eta beste *Leishmania* espezie batzuen aurrean.
- Konposatuen *in vivo* jarduera aztertu.

6. Erreferentziak

Alvar, J., Vélez, I., Bern, C., Herrero, M., Desjeux, P., Cano, J., Jannin, J., & den Boer, M. (2012). Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. *PLoS ONE, 7(5)*, e35671. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035671

Amela, C., Suarez, B., Isidoro, B., Sierra, M. J., Santos, S., & Simón F. (2012). Evaluación Del Riesgo de Transmisión de Leishmania Infantum En España. *Centro Coordinación de Alertas y Emergencias Sanitarias. Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad*. https://www.mscbs.gob.es/profesionales/saludPublica/ccayes/analisisituacion/doc/leishmania.pdf

Díaz-Regañón, D., Roura, X., Suárez, M. L., León, M., & Sainz, A. (2020). Serological Evaluation of Selected Vector-Borne Pathogens in Owned Dogs from Northern Spain Based on a Multicenter Study Using a Commercial Test. *Parasites and Vectors, 13(1)*, 301. https://doi.org/10.1186/s13071-020-04172-5

Dirección General de Salud Pública. Consejería de Sanidad. (2018). Red de Vigilancia Epidemiológica de La Comunidad de Madrid. Enfermedades de Declaración Obligatoria Protocolo de Vigilancia de La Leishmaniasis. *Comunidad de Madrid*.

El-Dirany, R., Shahrour, H., Dirany, Z., Abdel-Sater, F., Gonzalez-Gaitano, G., Brandenburg, K., Martínez-de-Tejada, G., & Nguewa, P. (2021). Activity of Anti-Microbial Peptides (AMPs) against Leishmania and Other Parasites: An Overview. *Biomolecules, 11*(7), 984. https://doi.org/10.3390/biom11070984

El-Dirany, R., Fernández-Rubio, C., Peña-Guerrero, J., Moreno, E., Larrea, E., Espuelas, S., Abdel-Sater, F., Brandenburg, K., Martínez-de-Tejada, G., & Nguewa, P. (2022). Repurposing the Antibacterial Agents Peptide 19-4LF and Peptide 19-2.5 for Treatment of Cutaneous Leishmaniasis. *Pharmaceutics, 14(11)*, 2528. https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14112528

Fernández-Rubio, C., Larrea, E., Peña-Guerrero, J., Sesma-Herrero, E., Gamboa, I., Berrio, C., Plano, D., Amin, S., Sharma, A. K., & Nguewa P. (2019). Leishmanicidal Activity of Isoselenocyanate Derivatives. *Antimicrobial agents and chemotherapy, 63(2)*, e00904-18. https://doi.org/10.1128/AAC.00904-18

Fernández Martínez, B., Gómez Barroso, D., & Cano Portero, R. (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. *Centro Nacional de Epidemiología. Instituto de Salud Carlos III. Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica, 27(2)*, 15–27. http://revista.isciii.es/index.php/bes/article/view/1086/1351

IkerGazte, 2023
Zientziak eta NaturaZientziak

Gálvez, R., Montoya, A., Cruz, I., Fernández, C., Martín, O., Checa, R., Chicharro, C., Miguelánez, S., Marino, V., & Miró, G. (2020). Latest Trends in Leishmania Infantum Infection in Dogs in Spain, Part I: Mapped Seroprevalence and Sand Fly Distributions. *Parasites and Vectors, 13(1)*, 204. http://doi.org/10.1186/s13071-020-04081-7

van Griensven, J, & Diro E. (2019). Visceral Leishmaniasis: Recent Advances in Diagnostics and Treatment Regimens. *Infectious Disease Clinics of North America, 33(1)*, 79–99. https://doi.org/10.1016/j.idc.2018.10.005

Herrador, Z., Gherasim, A., Jimenez, B. C., Granados, M., San Martín, J. V., & Aparicio P. (2015). Epidemiological Changes in Leishmaniasis in Spain According to Hospitalization-Based Records, 1997–2011: Raising Awareness towards Leishmaniasis in Non-HIV Patients. *PLOS Neglected Tropical Diseases, 9(3)*, e0003594. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003594

Nafarroako Osasun Publikoko Buletinak (1998-2021). Ihttp://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.

EAEko Osasun Publikoari Buruzko Txostenak eta Aldizkari Epidemiologikoak (1998-2021). https://www.euskadi.eus/informacion/informe-de-salud-publica/web01-a3vipub/es/.

Mcgwire, B. S., & Satoskar, A. R. (2014). Leishmaniasis: Clinical Syndromes and Treatment. *QJM: An International Journal of Medicine 107(1)*, 7-14. https://doi.org/10.1093/qjmed/hct116

Medina-Acosta, E., & Cross, G. A. M. (1993). Rapid Isolation of DNA from Trypanosomatid Protozoa Using a Simple 'mini-Prep' Procedure. *Molecular and Biochemical Parasitology, 59(2)*, 327–29. https://doi.org/10.1016/0166-6851(93)90231-l

Molina, R., Amela, C., Nieto, J., San-Andrés, M., González, F., Castillo, J.A., Lucientes, J., & Alvar, J. (1994). Infectivity of Dogs Naturally Infected with Leishmania Infantum to Colonized Phlebotomus Perniciosus. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 88(4)*, 491–93. https://doi.org/10.1016/0035-9203(94)90446-4

Mwangi, J., Hao, X., Lai, R., & Zhang, Z. (2019). Antimicrobial Peptides: New Hope in the War against Multidrug Resistance. *Zoological Research, 40(6),* 488-505. https://doi.org./10.24272/j.issn.2095-8137.2019.062

Oliveira, L. F., Schubach, A. O., Martin, M. M., Passos, S. L., Oliveira, R. V., & Marzochi, M. C. (2011). Systematic Review of the Adverse Effects of Cutaneous Leishmaniasis Treatment in the New World. *Acta Tropica, 118(2),* 87-96. https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2011.02.007

OMS (2010). Control de Las Leishmaniasis: Informe de Una Reunión Del Comité de Expertos de La OMS Sobre El Control de Las Leishmaniasis. *OMS, Serie de Informes Técnicos 949*.

Pasupuleti, M., Schmidtchen, A., & Malmsten, M. (2012). Antimicrobial Peptides: Key Components of the Innate Immune System. *Critical reviews in biotechnology*, *32(2)*, 143–71. https://doi.org/10.3109/07388551.2011.594423

Ready, P. D. (2010). Leishmaniasis Emergence in Europe. *Eurosurveillance*, *15(10)*, 29–39. https://doi.org/10.2807/ese.15.10.19505-en

Robles-Loaiza, A., Pinos-Tamayo, E. A., Mendes, B., Teixeira, C., Alves, C., Gomes, P., & Almeida, J. R. (2021). Peptides to Tackle Leishmaniasis: Current Status and Future Directions. *International Journal of Molecular Sciences, 22(9),* 4400 . https:/doi.org/10.3390/ijms22094400

Ruiz-Postigo, J. A. (2020). Global Leishmaniasis Surveillance, 2017–2018, and First Report on 5 Additional Indicators. *Weekly epidemiological record*, *95*, 281–300. https://www.who.int/news-room/feature-stories/detail/two-out-of-three-wild-

Sesma, B. & Barricarte, A. (1997). Leishmaniasis in Navarra: Review of Activities. *Anales del Sistema Sanitario de Navarra, 20(2),* 209-216. https://doi.org/10.23938/assn.0613

Sundar, S., & Rai, M. (2002). Laboratory Diagnosis of Visceral Leishmaniasis. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, *9(5)*, 951–58. https://doi.org/10.1128/CDLI.9.5.951-958.2002

Vacas, A., Fernández-Rubio, C., Larrea, E., Peña-Guerrero, J., & Nguewa P.(2020). LmjF.22.0810 from Leishmania Major Modulates the Th2-Type Immune Response and Is Involved in Leishmaniasis Outcome. *Biomedicines, 8(11),* 452. https://doi.org/10.3390/biomedicines8110452

Wortmann, G., Zapor, M., Ressner, R., Fraser, S., Hartzell, J., Pierson, J., Weintrob, A., & Magill, A. (2010). Lipsosomal Amphotericin B for Treatment of Cutaneous Leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg. 83(5),* 1028–1033. https://doi.org/10.4269/ajtmh.2010.10-0171

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, berriro ere, Maite Loperena Barber laguntzagatik. Eskerrik asko ere, Guillermo Martínez De Tejada, Klaus Brandenburg, Juan Pablo Fuenzalida eta Stephanie Grümbeleri. Azkenik, COVETNA, Gous Gorraiz, Clínica Veterinaria Víctor Andueza, Dejando Huella, Centro Veterinario Sangüesa eta Belén Carasa Clínica Veterinariaren partehartzea eskertu nahi dugu.

Petrolio eta bio iturrietatik eratorritako monomeroen konparaketa estaldura jasangarrien garapenerako

Sara Rubio, Aitor Barquero, Edurne González, Jose Ramon Leiza

POLYMAT, Kimika Aplikatua Saila, Kimika Fakultatea, Euskal Herriko Unibertsitatea UPV/EHU, Joxe Mari Korta Zentroa, Tolosa Hiribidea 72, 20018 Donostia

Sara.rubio@ehu.eus

Laburpena

Lan honetan komertzialki eskura dauden jatorri berriztagarriko bi monomero kopolimerizatu dira emultsio-polimerizazio bidez, isobornil eta 2-oktil akrilatoak hain zuzen ere, estaldura jasangarriak garatzeko helburuarekin. Polimerizazio erreakzioaren konbertsio globala, instantaneoa, eta partikula tamaina aztertu dira. Baita, lortutako polimeroaren propietate termikoak eta ur absortzioa ere, eta petroliotik eratorritako MMA/BA kopolimeroaren propietateekin alderatu dira. Lortutako emaitzek erakusten dute jatorri berriztagarriko estaldurak garatzea posible dela, merkatuan dauden produktuekiko lehiakorrak direnak.

Hitz gakoak: Emultsio-polimerizazioa, isobornil akrilatoa, 2-oktil akrilatoa, bio-polimeroak, estaldura jasangarriak

Abstract

In this work, two commercial and bio-based monomers were copolymerized by emulsion polymerization, namely isobornyl and 2-octyl acrylate, on the way to developing sustainable coatings. Particle size, global, and instantaneous conversions of the polymerization reaction were analyzed. Also, the thermal properties and water absorption of the obtained polymer and the properties of the petroleum-derived MMA/BA polymer were compared. The results obtained show that it is possible to develop bio-based coatings, competitive with products on the market.

Keywords: Emulsion polymerization, isobornyl acrylate, 2-octyl acrylate, biopolymers, bio-coatings.

1. Sarrera eta motibazioa

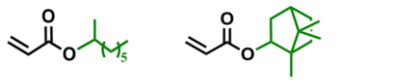
Klima-aldaketa eta ingurumenaren degradazioa gaur egungo kezka eta arazo nagusienak dira, bai Europarentzat bai mundu osoarentzat. Hori dela eta, Europar Batasunak berotegi-efektuko gasen emisioak erabat gelditzea du helburu 2050 urterako, klimatikoki-neutrala den lehenengo kontinentean bilakatuz. Helburu hori lortzeko, eskuragarri dauden energia-ituri berriztagarri guztien ekarpena behar beharrezkoa da, hala nola, energia eolikoa, eguzki energia, energia hidraulikoa eta abar. Kontuan hartuz lurrazalaren % 71 urez estalita dagoela, interes handiko eremua da hau energia berdea ekoizteko. Zentzu honetan, Europar Batasunaren estrategia itsasoko energia-berriztagarriaren potentziala aprobetxatzea da (COM(2020) 741)[1], *offshore* itsas azpiegitura fotovoltaiko flotanteak erabiliz. NaturSea-PV[2] proiektuan diziplina anitzeko 11 bazkidek parte hartzen dute, eta hauen helburu nagusia itsas azpiegituren bizi-iraupena hobetzea da, prozesu eta material zirkular berriak garatuz. Materialen bizi-iraupena luzatzeko eta bermatzeko, estaldura polimerikoak ezinbestekoak dira. Euskal Herriko Unibertsitateak eta Polymat zentroak estaldura jasangarrien garapenean lan egingo dute NaturSea-PV proiektuaren barnean, plaka fotovoltaikoak eta azpiegiturak itsasoko baldintza zakarretatik babesteko, korrosiotik eta zikintzetik hain zuzen ere.

1-https://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/TXT/?uri=CELEX:52020DC0741
2-https://www.natursea-pv.eu/

Estaldurak polimeroz osaturik dauden produktuak dira, eta gainazalak babestea eta apaintzea dute funtzio nagusi. Tradizionalki estaldurak disolbatzaile organikoetan merkaturatu ohi izan dira baina azken hamarkadetan merkatua uretan oinarritutako estalduretara lerratzen ari da. Uretan oinarritutako estalduren osagai nagusia latexa da. Hori, uretan barreiatuta dauden polimero partikula nanometrikoz osaturik dago eta emultsio-polimerizazio bidez sintetizatzen da. Nahiz eta ura fase jarraitu bezala erabili, emultsio formulazioaren beste erdia erregai fosilen baliabideetatik datozen lehengaiez osaturik dago, osagai nagusiena monomeroa izanik. Hori dela eta, azken urteetan ikerketa-ahalegin handiak burutu dira jatorri berriztagarriko lehengaiak bultzatzeko eta erregai fosiletatik lortzen diren produktuak ordezkatzeko.

Biomasa iturri berriztagarri zabala da. Monomeroen sintesirako landare olioak eta terpenoak biomasa iturri interesgarriak dira horien kostu baxuagatik eta ugaritasunagatik (Gandini *et all.*, 2016). Gaur egun iturri berriztagarrietatik lor daitezkeen monomeroetatik oso gutxi daude komertzializatuta oraindik, produktu berrien garapena motelduz. 2-oktil eta isobornil akrilatoak interes handiko monomeroak dira, komertzializatuak baitaude eta hauen eduki berriztagarria % 70 baino altuagoa delako. 2-Oktil akrilatoa errizino-oliotik lortzen da eta bere homopolimeroa biguna da, -44 ºC beira trantsizio tenperatura (Tg) duelarik. Bestalde, isobornil akrilatoa pinu erretxina jatorrikoa da eta bere homopolimeroa aldiz gogorra da, bere Tg-a 90 ºC inguru izanik. 1. irudian monomeroen egiturak eta eduki berriztagarriak aurkezten dira (Aguirre et al., 2020).

1.irudia. Erabilitako monomeroen egitura.



2-Oktil akrilatoa 2OA (%73) Isobornil akrilatoa IBOA (%77)

Lan honetan bi monomero hauek erabili dira estaldura jasangarriak lortzeko. Bi monomeroak kopolimerizatu dira emultsio-polimerizazio bidez eta lortutako filmaren propietateak erregai fosil jatorrizko monomeroekin alderatu dira, metil metakrilatoarekin (MMA) eta butil akrilatoarekin (BA) hain zuzen ere.

2. Arloko egoera eta ikerketaren helburua

2-Oktil akrilatoari dagokionez, hainbat patente daude monomero hau erabiltzen dituztenak itsasgarriak egiteko (Fei *et al.*, 2010). Gainera monomeroaren zinetika eta mikroegitura aztertu eta monomero komertzialekin alderatu izan da (Barrenetxe *et al.*, 2022). Baita, isobornil metakrilatoarekin (IBOMA) batera, uretan sintetizaturiko itsasgarriak ere lortu dira (Badía *et al.*, 2019). Horretaz gain, IBOMA/2OA monomeroak emultsio-polimerizazio bidez estaldurak egiteko ikertu dira kaseina egonkortzaile bezala erabiliz, nahiz eta MMA ehuneko txikiak erabili behar izan ziren polimerizatu ahal izateko (Allasia *et al.*, 2022). Mini-emultsio bidez IBOMA/2OA polimerizatu dute CeO_2 partikulak gehituz eta korrosioaren aurkako estaldura bezala aztertu da (González *et al.*, 2021). Bestalde, emultsio-polimerizazio bidez IBOMA gehitzeko zailtasunak aztertu dituzte. (Llorente *et al.*, 2022).

Lan honen helburua da IBOA eta 2OA monomeroen kopolimerizazioa aztertzea emultsio-polimerizazio bidez, eta lortutako polimeroaren propietateak petroliotik eratorritako MMA/BA polimeroarekin alderatzea.

3. Ikerketaren muina

3.1. Atal esperimentala

Materialak

Metil metakrilatoa (MMA, Quimidroga), butil akrilatoa (BA, Quimidroga), 2-oktil akrilatoa (2OA, Arkema) eta Visiomer® Terra isobornil akrilatoa (IBOA, Evonik) monomeroak erabili ziren. Ur destilatua, potasio peroxodisulfatoa (KPS, Sigma Aldrich) eta alkil difenil oxido disulfonatoa (Dowfax 2A1, Dow chemicals) latexen sintesirako erabili ziren.

Latexen sintesia

Latexak emultsio-polimerizazio bidez sintetizatu ziren modu erdi-jarraituan, MMA/BA ereina erabiliz. Lehenik eta behin MMA/BA erein latexa sintetizatu zen, 50/50 pisu erlazioarekin. 2 L-ko erreaktorean, % 20 solido edukiko 1,8 kg latex prestatu zen modu ez jarraituan, 70 ºC-tan nitrogenodun atmosferan, eta 200 rpm-ko abiadura erabiliz irabiagailuan. 1. taulan agertzen den formulazioa erabili zen eta erreakzioak 4 ordu iraun zuen.

1.taula. MMA/BA ereina sintetizatzeko erabilitako formulazioa.

Erreaktiboak	Kantitatea (g)
MMA	180
BA	180
Dowfax 2A1	7,2
H_2O	1310
KPS	3,6

MMA/BA latexa sintetizatzeko 250 mL-ko erreaktorea erabili zen, eta 200 g latex % 40 solido edukiarekin prestatu ziren. Erreakzioa modu erdi-jarraituan burutu zen. Beraz, erreaktorean hasierako karga bezala ura eta ereina ipini ziren, eta MMA eta BA monomeroak elikatuz joan ziren erreakzioan zehar 3 orduz 0,7 g/minutuko abiadurarekin, hasarazlea gehitu ondoren. Erreakzioa 75 ºC-tan, nitrogenodun atmosferan eta 200 rpm irabiagailu abiadurarekin burutu zen. Elikadura amaitzerakoan, ordu bat utzi zen erreakzioa post-polimerizatzen. 2. taulan aurkezten diren kantitateak erabili ziren.

2.taula. MMA/BA latexa sintetizatzeko erabilitako formulazioa.

Formulazioa		Kantitatea (g)
Hasierako karga	H_2O	70,6
	Latex ereina	26,5
	KPS	0,74
Aurre-emultsioa	MMA	37,4
	BA	37,4
	H_2O	49,4
	Dowfax 2A1	1,7

Jatorri berriztagarriko latexari dagokionez, IBOA/2OA latexa % 32 solido edukiarekin prestatu zen eta monomero erlazioa pisuan 51/49 izan zen. Erreakzioa baldintza berdinetan burutu zen, eta monomeroak 0,3 g/minutuko abiadurarekin elikatu ziren. Erabilitako formulazioa 3.taulan aurkezten da.

3.taula. IBOA/2OA latexa sintetizatzeko erabilitako formulazioa.

Formulazioa		Kantitatea (g)
Hasierako karga	H_2O	26,7
	Latex ereina	9,9
	KPS	0,28
Aurre-emultsioa	IBOA	14,2
	2OA	13,7
	H_2O	25,8
	Dowfax 2A1	0,7

Karakterizazioa

Latexen solido edukia (*S.E*) grabimetrikoki kalkulatu zen latexa labean sartu aurretik eta lehortu ondoren pisatuz, 1. ekuazioan adierazten den moduan. Laginak labean lehortu ziren 65 ºC-tan pisu konstantea lortu arte.

$$S.E = \frac{lehortutako\ materialaren\ pisua}{latexaren\ pisua} \quad (1)$$

Konbertsio instantaneoa (*Xt*) lortutako S.E-tik kalkulatu zen, 2. ekuazioa erabiliz.

$$X(t) = \frac{(S{:}E(t)\cdot Lt(t)) - NPS}{M_0 - F_M \cdot t} \quad (2)$$

Non *S:E* solido edukia, *Lt* latex totala eta *NPS* polimerizatu ezin diren solidoak (hasarazlea, eta surfaktantea) dira t denboran (gramoetan). M_0 monomero kantitatea erreakzio hasieran (gramoetan), F_M elikatze abiadura (gramo/minutuko) eta *t* elikatze denbora (minututan) dira.

Partikulen tamaina argiaren dispertsio dinamiko (DLS) bidez karakterizatu ziren. Laginak latexaren frakzio bat hartuz eta diluituz prestatu ziren.

Sintetizatutako polimeroen propietate termikoak aztertu ziren kalorimetria diferentzialaren ekorketa bidez. Beira trantsizio teorikoak kalkulatu ziren ere bai Fox ekuazioarekin, 3. ekuazioa erabiliz, non Tg_{co} kopolimeroaren beira trantsizio tenperatura eta W_f formulazioan erabilitako polimero bakoitzaren pisu frakzioak diren.

$$\frac{1}{Tgco} = \frac{Wf1}{Tg1} + \frac{Wf2}{Tg2} \quad (3)$$

Latexetatik lortutako filmen ur absortzioa (*WA*) ere karakterizatu zen. Horretarako, film zati bat moztu, eta pisatu (W_d) zen. Gero 15 mL-ko bial batean sartu eta ur destilatuz bete zen, filma urez ondo estalirik zegoela baieztatuz. 24 ordu igaro ondoren, lagina atera, paper batekin gainazala lehortu, pisatu (W_w) eta berriz potean sartu zen. Ur absortzioa denbora tarte desberdinetan neurtu zen 4. ekuazioa erabiliz, eta neurketak triplikatuan egin ziren desbideratze estandarra lortzeko pisaketa bakoitzean.

$$\%\ WA = \frac{W_w - W_d}{W_d} x100 \quad (4)$$

3.2. Emaitzak eta ondorioak

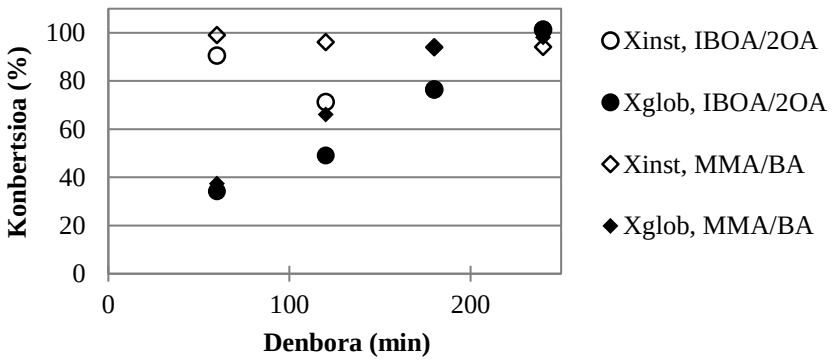
4. taulan aurkezten dira MMA/BA ereinaren konbertsioa, solido edukia, partikula tamaina eta partikulen distribuzioa (PDI). Ikusi daitekeen bezala, konbertsio altua eta zehaztutako solido edukia lortu dira, 100 nm tamainako partikula tamainarekin eta PDI estuarekin. Lortutako datuak onak zirenez, ereina ondorengo emultsioetan erabili zen polimerizazioa errazteko eta partikulen tamaina kontrolatu ahal izateko.

4.taula. Sintetizatutako MMA/BA ereinaren propietateak.

Konbertsioa (%)	97
Solido edukia (%)	19,9
Partikula tamaina (nm)	100
PDI	0,06

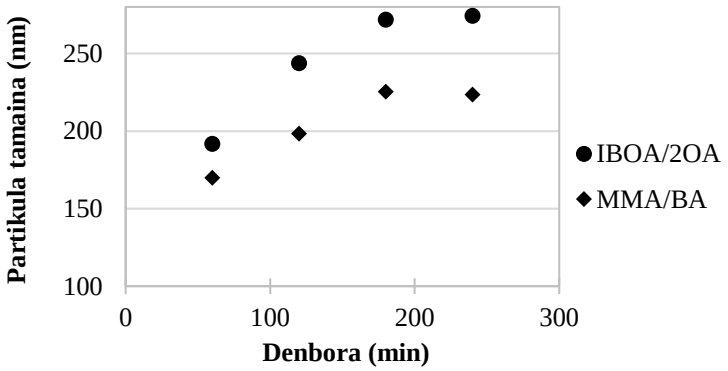
MMA/BA eta IBOA/2OA emultsio-polimerizazioak prozedura berdina jarraituz burutu ziren, solido eduki desberdinak erabiliz. Erreakzioa amaitzerakoan, ez zen koagulorik aurkitu erreaktorean, latex egonkorren seinale. 2. irudian MMA/BA eta IBOA/2OA emultsio polimerizazioen konbertsio globala eta instantaneoa irudikatu dira. Bi kasuetan, amaierako konbertsioa altua izan da, monomero guztia polimerizatu duela adieraziz. Konbertsio instantaneoari dagokionez, MMA/BA-rena altuagoa izan da erreakzio osoan zehar. Honen arrazoia IBOA eta 2OA monomeroen kontzentrazio baxua ur fasean izan daiteke, hauen hidrofobotasun altua dela eta.

2. irudia. Konbertsio instantaneoa eta globalak MMA/BA eta IBOA/2OA polimerizazioetan.

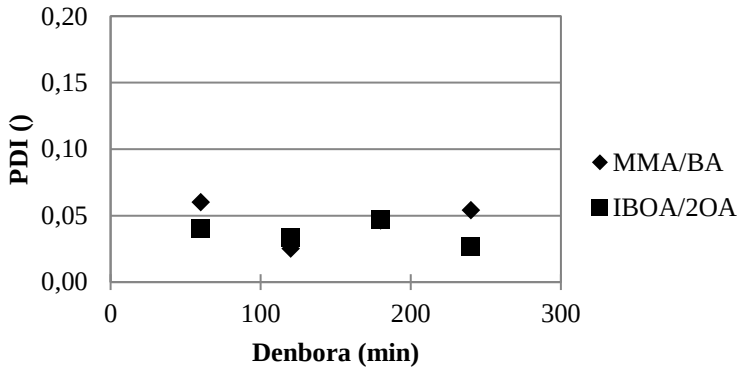


Partikula tamaina erreakzioan zehar neurtu zen eta hau 3. irudian aurkezten da. Erabilitako ereinari esker, partikula tamainaren eboluzio ona eta kontrolatua ematen da bi kasuetan. Ikus daitekeen bezala, IBOA/2OA sistemak amaierako partikula tamaina handiagoa ematen du, 274 nm, eta MMA/BA-ak 221 nm. Bi kasuetan 250 nm-tik hurbil, hau jomuga baizen. Partikulen distribuzioari dagokionez, hau ere bai estua izan da erreakzio osoan zehar, latex monodispertsatuak lortuz. 4. irudian erreakzio bakoitzaren partikulen PDI irudikatu da denboran zehar.

3. irudia. MMA/BA eta IBOA/2OA sistemen partikulen diametroaren eboluzioa denboran zehar.



4.irudia. MMA/BA eta IBOA/2OA latexen partikulen distribuzioa denboran zehar.



Lortutako kopolimeroen propietateak aztertzeko, lehenik eta behin filmak eratu ziren. Horretarako, latexak lehortzen utzi ziren giro tenperaturan 4 egunez. Monomero bakoitzetik erabilitako pisu erlazioa eta homopolimeroen Tg-a jakinda, kopolimeroen Tg teorikoa lortu daiteke Fox ekuazioa erabiliz. Polimeroen Tg esperimentala DSC kurbaren inflexio puntutik lortu zen. Filma eratzeko gutxieneko tenperatura (MFFT) ere neurtu zen. 5. taulan alderatzen dira Tg teorikoa, Tg esperimentala eta neurtutako MFFT-a. Tg-ari dagokionez, nahiz eta teorikoaren berdina ez izan, bi kasuetan lortutako Tg-a aplikazio tenperaturaren azpitik daude (kasu honetan giro tenperatura). Emaitza esperimentalen desbideratzea teorikoetatik normala da. Izan ere, homopolimeroarentzat erabilitako Tg balioa askotan ez da balio zehatz bat baizik eta balio tarte eremu bat. Filmak eratzeko gutxieneko tenperatura ere bai giro tenperaturaren baino baxuagoa denez, film koherenteak lortuko dira giro tenperaturan aplikatzerako garaian. Hala ere, IBOA/2OAren Tg balio hain baxuak eragina izango du propietate mekanikoetan.

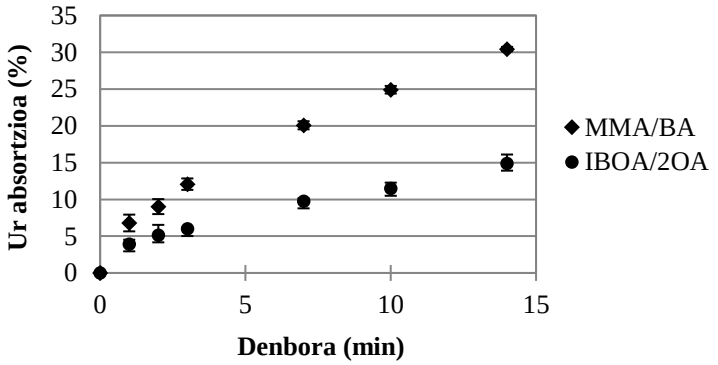
5.taula. MMA/BA eta IBOA/2OA polimeroen propietate termikoak.

Polimeroa	Tg teorikoa (ºC)	Tg esperimentala (ºC)	MFFT (ºC)
MMA/BA	11,2	17	8,8
IBOA/2OA	10	0,5	<5

Polimeroen hidrofobotasuna aztertzeko, eratutako filmen ur absortzioa neurtu zen denbora tarte desberdinetan. 5.Irudian ur absortzioa denboraren aurrean irudikatu da. Lehenengo 24

orduak pasa ondoren, ikus daiteke MMA/BA-ren ur absortzioa handiagoa dela IBOA/2OA-arena baino. Bi aste pasa ondoren, MMA/BA-ren ur absortzioa IBOA/2OA-ren bikoitza da, IBOA/2OA polimeroaren hidrofobotasun altua erakutsiz. Froga honen bidez erakusten da jatorri berriztagarriko polimeroak urarekiko erresistentzia altuagoa duela eta ondorioz, propietate hobeak.

5.irudia. Sintetizatutako kopolimeroen ur absortzioa denboran zehar.



4. Ondorioak

Lan honetan bio jatorritik eratorritako IBOA eta 2OA monomero komertzialen emultsio-polimerizazioa burutu da, kopolimeroa karakterizatu da eta fosil jatorriko MMA/BA kopolimeroarekin alderatu da.

IBOA/2OA latex egonkorra lortu da 51/49 pisu erlazioa erabiliz % 32 solido edukian. Ereinaren erabilerak partikulen tamaina kontrolatzen lagundu du, MMA/BA polimerizazioaren antzeko portaera lortuz, nahiz eta konbertsio instantaneo baxuagoa izan monomeroen hidrofobotasuna dela eta. Propietate termikoei dagokionez, bi polimeroek film koherenteak eratzeko gai dira 25 ºC baino baxuagoko tenperaturetan. Erabilitako monomero proportzioekin, IBOA/2OA polimeroak MMA/BA baino Tg baxuagoa aurkeztu du. Hidrofobotasunari dagokionez, ur absortzio neurketen bidez erakutsi da IBOA/2OAren hidrofobotasun altua MMA/BA polimero komertzialarekin alderatua. Beraz, IBOA/2OA jatorri berriztagarriko kopolimeroak merkatuan dauden petrolio eratorritako polimeroekin lehiatzeko potentziala duela eta estaldura jasangarrien garapena bultzatzen duela esan daiteke.

5. Etorkizunerako planteatzen den norabidea

Lana osatzeko, IBOA/2OA kopolimeroaren propietate mekanikoak aztertzea interesgarria izango litzateke. Baita, IBOA monomero kontzentrazioa eta solido edukia igotzeak polimerizazioan izango duen eragina aztertzea ere. Bestalde, IBOA/2OAren propietate mekanikoak hobetzeko beste teknika batzuk probatu daitezke, hala nola film eraketan zehar saretzeko gaitasuna duten monomeroak.

Lan honetan IBOA eta 2OA monomeroak ikertu dira, baina antzeko propietateak dituzten bio-jatorriko eta hidrofoboak diren monomeroen zerrenda luzea da. Adibidez 3,7-dimetil-1-oktanola (tetrahidrogeraniola) eta tetradekanola landare jatorria duten alkoholak dira, zeintzuk esterifikazio erreakzio baten bidez akrilatoan funtzionalizatu daitezkeen eta emultsio bidez polimerizatu. Hauen kopolimerizazioa IBOA monomerorekin ikertzea izango dira hurrengo urratsak.

6. Erreferentziak

Aguirre, M., Hamzehlou, S., González, E., & Leiza, J. R. (2020). Renewable feedstocks in emulsion polymerization: Coating and adhesive applications. *Advances in Polymer Reaction Engineering*, , 139. doi:10.1016/bs.ache.2020.07.004

Allasia, M., Aguirre, M., Gugliotta, L. M., Minari, R. J., & Leiza, J. R. (2022). High biobased content waterborne latexes stabilized with casein. *Progress in Organic Coatings, 168*, 106870. doi:10.1016/j.porgcoat.2022.106870.

Badía, A., Movellan, J., Barandiaran, M. J., & Leiza, J. R. (2018). High biobased content latexes for development of sustainable pressure sensitive adhesives. *Industrial & Engineering Chemistry Research, 57*(43), 14509-14516. doi:10.1021/acs.iecr.8b03354.

Barrenetxe, M., Agirre, A., Santos, J. I., Badía, A., Leiza, J. R., & Barquero, A. (2022). Oil-Based versus Bio-Based C8 alkyl chain (meth)acrylates in emulsion polymerization: Kinetics and microstructure. *Macromolecular Reaction Engineering, 16*(6), 2200014-n/a. doi:10.1002/mren.202200014

Fei, C.; Danuta, C. Pressure Sensitive Adhesive Composition for Medical Use. EP. Patent 2221067 A1, 2010

González, E., Stuhr, R., Vega, J. M., García-Lecina, E., Grande, H., Leiza, J. R., & Paulis, M. (2021). Assessing the effect of CeO2 nanoparticles as corrosion inhibitor in hybrid biobased waterborne acrylic direct to metal coating binders. *Polymers, 13*(6), 848. doi:10.3390/polym13060848.

Llorente, O., Barquero, A., Paulis, M., & Leiza, J. R. (2022). Challenges to incorporate high contents of bio-based isobornyl methacrylate (IBOMA) into waterborne coatings. *Progress in Organic Coatings,172*, 107137. doi:10.1016/j.porgcoat.2022.107137

7. Eskerrak eta oharrak

Eskerrak Euskal Herriko Unibertsitateari (UPV/EHU) eta Europar Batasuneko NaturSea-PV (101084348) proiektuari laguntza ekonomikoarengatik.

Onddo mikorriziko arbuskularrak: nekazaritza ereduaren eta Arabako babarrun barietateen eragina

Irati Ijurco-González[1], Estibaliz Sarrionandia-Areitio[1], Arantza del-Canto[1], Maite Lacuesta[1]

[1]*Farmazia Fakultatea, UPV/EHU.*
irati.ijurco@ehu.eus

Laburpena

Jendartearen elikadura beharrizanak asetze aldera, eta egungo aldaketa globalaren aurrean, agroekosistemen kalitatea eta emankortasuna bermatu nahi badira, lurzoruko mikroorganismoen biodibertsitatea indartzea funtsezkoa da; tartean, landareekin sinbiosi mutualistak eratzen dituzten onddo mikorriziko arbuskularrena. Nekazaritza ereduak baduenez aurreko guztian eragina, eta agrobiodibertsitatearen kontra, oro har, geroz eta labore-barietate gutxiago erabiltzen denez, nekazaritza konbentzionalak eta ekologikoak Arabako lautadan ekoizten diren lau barietateren mikorrizazio mailan duten eragina aztertu da. Nekazaritza ekologikoak dibertsitatea sustatzen duela ikusi da, eta, ondorioz, mikorrizazioa areagotzeaz gain, barietate batzuen mikorrizek egoera funtzional hobea erakutsi dute.

Hitz gakoak: Glomeromycota, dibertsitate fungikoa, sinbiosia, *Phaseolus vulgaris*, nekazaritza ekologikoa.

Abstract

Strengthening the biodiversity of soil microorganisms, including arbuscular mycorrhizal fungi (which form mutualistic symbioses with plants), is essential to meet the food needs of society and to ensure the quality and fertility of agroecosystems given the current global change. Since the agricultural model affects all of the above, and contrary to agrobiodiversity, the use of crop varieties, in general, is decreasing, the influence of conventional and organic farming on the degree of mycorrhization of four varieties produced in the Llanada Alavesa has been analysed. Organic agriculture promoted diversity, which not only increased mycorrhization, but also the mycorrhizae of some varieties showed a better functional state.

Keywords: Glomeromycota, fungal diversity, symbiosis, Phaseolus vulgaris, organic farming.

1. Sarrera eta motibazioa

Egungo nekazaritzak hainbat erronkari egin behar die aurre: a) populazio gero eta handiagoa elikatzeko elikagaiak modu jasangarrian ekoiztea, baliabideak modu eraginkorragoan erabilita (Moore et al., 2016); b) erabat degradatuta dauden nekazaritza lurren egoera hobetu eta emankortasuna bermatzea; c) aurreikusten ziren (Eusko Jaurlaritza, 2015; IPCC, 2014) eta, dagoeneko, gertatu diren (Toreti et al., 2022) lehorteak bezalako muturreko egoera klimatologikoen intzidentzia eta larritasun egoeratan laboreak ekoitzi. Bestalde, milaka urtez hautatu eta lekuan lekura egokitu eta landatu diren labore-barietateen %90 galdu da mundu mailan (FAO, 2005), gero eta zabalduago eta unibertsalagoak diren gutxi batzuen mesedetan.

Agrobiodibertsitate kontzeptuak barne hartzen ditu ekoizten diren laboreen aldaera guztiak eta horien hazkundean eta garapenean eragiten duten gainerako organismo guztiak (FAO, 2005). Lurzoruko mikroorganismoek ekosistemen egitura eta funtzioetan eragin zuzena dute (Bardgett eta van der Putten, 2014). Hartara, lurzoruen kalitatea eta emankortasuna hobetu eta ingurumen-aldaketetara landareen egokitzeko gaitasuna areagotzeko, ezinbestekoa da mikroorganismo horien jarduera eta funtzioak sustatzea; funtsean, biodibertsitatea handitzea (Bender et al., 2016; Toju et al., 2018).

Lurzoruan dauden askotariko organismoen artean, Glomeromycota dibisioko onddoek interes handia dute nekazaritzarako (Rillig et al., 2016); mikorriza (Grezieratik *myces*, onddo eta *rhiza*, sustrai) arbuskularrak eratzen dituzte landareekin eta horiei esker landareak inguruneko baldintzetara hobeto egokitzen dira, besteak beste, ura eta mantenugaiak (batez ere P) eskuratzeko gaitasuna eta estresarekiko tolerantzia hobetzen direlako (Saia et al., 2014; Tahat et al., 2020). Ondorioz, estres egoeretan, mikorrizatutako landareek abantaila dute, euren egoera fisiologikoa hobetu ez ezik, laboreen errendimendua ere hobetzen duela behatu baita (Gholamhoseini et al., 2013; Posta eta Hong Duc, 2020).

Dena den, onddo mikorriziko arbuskular (OMA) espezie guztiek ez dutenez portaera bera erakusten ingurumen-baldintza ezberdinen aurrean (Egerton-Warburton et al., 2005), haien hazkuntza ez ezik, aberastasuna eta aniztasuna ere sustatzea ezinbestekoa da (Manoharan et al., 2017). Azken hamarkadetan emandako nekazaritzaren intentsifikazioak, ordea, lurzoruaren egitura, emankortasuna eta biodibertsitatea kaltetu ditu (Alguacil et al., 2014; Hakeem et al., 2014). Horren aurrean, nekazaritza ekologikoa mikroorganismoen jarduera eta biodibertsitatea sustatzeko estrategia eraginkorra da (Manoharan et al., 2017; Verbruggen et al., 2010).

2. Arloko egoera eta ikerketaren helburuak

Mundu mailako landareen %80k elkarte sinbiotiko mutualistak eratzen ditu Glomeromycota dibisioko onddo espezieekin, tartean, labore gehienak (Brundrett, 2009). Guztira, 200 bat onddo-espeziek osatzen dute dibisioa (Schüβler et al., 2001); gainontzeko onddoetan ez bezala, ez zaie ugalketa sexualik ezagutzen eta derrigorrezko sinbionte mutualistak dira. Landare sustraiek jariatutako kinada kimikoei erantzunez lurzoruan dauden espora asexual erresistente eta handiak hozitu, mizelioa garatu, hifak sustrai barnera sartu eta sinbiosia eratzen da. Horrela, OMAen bereizgarri diren egitura fungikoak garatzen dira: onddo eta landarearen arteko mantenugaien truke-bidea diren arbuskuluak eta intereseko substantziak biltegiratzen dituzten besikulak (Giovannetti et al., 2010).

Tradizionalki, esporen morfologia erabili da onddo horiek sailkatu eta euren dibertsitatea aztertzeko (Brundrett et al., 1996), eta egun, lurzoruetako OMAen dibertsitatea aztertzeko teknika molekular berriak erabiltzen badira ere, ikerketa ezberdinak ondorio berdinera heltzen dira: ohiko eredu intentsiboak sustatutako praktikek dibertsitatea murriztu eta komunitateak kaltetzen dituzte (Avio et al., 2013; de Graaff et al., 2019), eredu ekologikoak, ordea, dibertsitatea hobetu eta ondorioz, laboreen errendimendua ere hobetzen du (Manoharan et al., 2017; Oehl et al., 2004). Dibertsitatea esporetan oinarrituta aztertzeak espora dentsitatea ere aztertzea ahalbidetzen du, eta adierazle hori garrantzitsua izan daiteke, propagulu kantitateak OMAek landare ostalarien sustraiak mikorrizatzeko duten gaitasuna baldintzatu dezakeelako (Oliveira eta Sanders, 1999).

Bestalde, egitura sinbiotiko gehiago agertzen dira eredu ekologikoan landutako laboreen sustraietan, eta, beraz, eredu konbentzional intentsiboarekin konparatuta, laboreen kolonizazio mikorrizikoa handiagoa izaten da (Banerjee et al., 2019; Bedini et al., 2013). Horretaz gain, gutxi ikertu bada ere, landatutako barietateek, egoera berdinean, mikorrizazioari desberdin erantzuten diotela ikusi da (Estaún et al., 2010), eta barietatearen eta nekazaritza ereduaren arteko interakzioa ere gerta daitekeela behatu da (de Leon et al., 2020).

Araban, 3500 ha inguru hartzen dute nekazaritza ekologikoan lantzen diren lurrek, eta babarrunak (*Phaseolus vulgaris* L., Fabaceae familia) ekoizpen eta kontsumo tradizio handia du Araban, eta baita Euskal Herria osoan ere. Urtean 1200 tona inguru ekoizten dira (Eusko Jaurlaritza, 2018) eta, hainbat barietate ereiten den arren, Euskolabel kalitate-marka propioa duen *Pinta Alavesa* da barietaterik ugariena. Badirudi, dena den, ekoizpen handiko barietate berriagoak onddo mikorrizikoekiko selektiboagoak direla tradiziozko barietateak baino (Parvin et al., 2021).

Erabat ezezaguna da, alde batetik, nolakoa den Arabako nekazaritza lurzoruetako mikroorganismoen biodibertsitatea eta nekazaritza ereduak OMAetan izan dezakeen eragina lurraldean, eta, bestalde, bertako babarrun barietateek inguruko OMAen mikorrizazioari nola erantzuten dieten. Beraz, lan honen helburuak dira nekazaritza ereduak lurzoruko onddo mikorriziko arbuskularren biodibertsitatean duen garrantzia aztertu, eta aniztasun horrek babarrun barietate ezberdinen mikorrizazioan duen eragina zehaztea.

3. Ikerketaren muina

3.1 Diseinu esperimentala eta laginketak

Nekazaritza ereduak babarrun barietateen mikorrizazioan duen eragina aztertzeko, Neikerrek Arkautin (Araba) dituen lursail ekologiko (E) eta konbentzionaletan (K) lan egin zen. Lursail horietako Glomeromycota onddoen dibertsitatea esporen azterketatik zehaztu zen, eta horretarako, lursail bakoitzeko hainbat lagin jaso, homogeneizatu eta hoztuta (4ºC) gorde ziren. Nekazaritza eredu bakoitzean Arabako lautadan erabiliak diren *Arabako pinta* (AP) eta *Arabako*

arroz babarruna (AA) (Rodriguez Izagirre et al., 2006), gutxiago ezagutzen den, *Verde de Orbiso* (VO) barietate tradizionala eta Araban ez, baina Leonen tradizionala den *Riñon de León* (RL) babarrun barietateak erein eta hazi ziren ausazko blokeen diseinua jarraituta. Abuztuan, hazkuntza-zikloaren erdian, tratamendu bakoitzeko 14 landare ausaz altxatu eta, bakoitzaren sustraiak kontu handiz garbitu ostean, 45ºC-tan lehortu ziren, mikorrizazioa aztertu arte kontserbazioa bermatzeko.

3.2 Esporen erauzketa eta sailkapena

Ekologikoan eta konbentzionalean kudeatutako lurzoruko lagin bakoitzetik, 50 gramoko hiru erreplika tekniko hartu eta esporak bahetze, dekantazio eta iragazte prozesuak jarraituta erauzi ziren (Daniels eta Skipper, 1982). Horretarako, baheak poro-tamaina handienetik txikienera (850 µm, 250 µm, 100 µm, 32 µm) ordenatuta zutabean kokatu eta, urarekin lagunduta, lur laginak garbitu ziren. Jarraian, lehen bahean geratutako material handia baztertu eta, besteetan jasotako sedimentua %80ko kontzentrazioko sakarosa disoluzioarekin nahastu eta 4 minutuz 3000 r/min-ko maiztasunean zentrifugatu zen. Behin frakzio minerala dekantatuta, likidoa atera, sakarosa garbitu eta suspentsioan zeuden esporak iragazpaperean jaso ziren. Esporak, lupa (Nikon SMZ1000 modeloa) erabilita, banan-banan hartu eta polibinilo alkoholarekin (PVA) portatan finkatu ziren. Azkenik, mikroskopioaz (Nikon Eclipse E600 modeloa) baliatuta, ezaugarri morfologikoen arabera morfoespezietan sailkatu ziren (Brundrett et al., 1996). Horrez gain, beste 50 gramo lur pisatu eta lehortu ziren lurraren pisu lehorra estimatzeko.

Lursail eta lagin bakoitzetik hurrengoa kalkulatu zen: espora-kopuru totala, morfoespezie kopurua eta bakoitzaren ugaritasun totala eta erlatiboa; eta, azken horretan oinarrituta, morfoespezieak arraro, ohiko, ugari eta dominatzaile gisa sailkatu ziren, hurrengo portzentaien arabera, hurrenez hurren: <%5, %5-15, %15-25 eta >%25. Bestalde, erreplika bakoitzeko espora-dentsitatea (lurzoru-gramoko) eta Shannon-Weaverren (H') dibertsitate-indizea kalkulatu ziren. Nekazaritza ereduak espezie aberastasunean izandako eragina aztertzeko SPSS Statistics 26.0 (IBM Corporation) erabili zen. Datuen hondakin ez-estandarizatuen normaltasuna eta bariantzaren homozedastizitatea egiaztatzeko, Shapiro-Wilk eta Levenne testak erabili ziren, hurrenez hurren. Ondoren, aldagai bakoitzarentzat faktore bateko bariantzaren analisia (ANOVA) egin zen, %95eko konfiantzan. Ezberdintasun esanguratsuak asteriskoen bidez adierazi ziren (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

3.3 Babarrun barietateen mikorrizazio-maila

Mikorrizazioa aztertzeko, sustraiak 24 orduz berridratatu eta Phillips eta Hayman (1970)-en prozedurari jarraiki, sustraiak KOHan argitu eta barruko egitura fungikoak anilina urdinarekin tindatu ziren (Grace eta Stribley, 1991). Ostera, laginak formol: alkohol: azido azetiko (FAA) nahastean murgilduta ontziratu ziren, portatan PVAn finkatu ziren arte. Porta horiek mikroskopioan x40ko handipenarekin aztertu ziren eta ebaketa handituen metodoaren bidez onddo egituren presentzia zehaztu zen lagin bakoitzeko 100 puntutan (McGonigle et al., 1990), mikorrizazioa aztertzeko behatzailearekiko mendekotasun txikiena duelako (Füzy et al., 2015).

Hifa (HK), arbuskulu (AK) eta besikulen (BK) kolonizazioa ehunekotan adierazi eta datuak SPSS Statistics 26.0 (IBM Corporation) erabiliz aztertu ziren. Datuen hondakin ez-estandarizatuen normaltasuna eta bariantzaren homozedastizitatea egiaztatu eta, nekazaritza ereduak (NE) eta babarrun barietateek (B) mikorrizazioaren parametroetan izandako eragina aztertzeko, aurreko biak faktore nagusi gisa eta erreplikak ausazko efektu gisa kontsideratuta, bi norabideko bariantzaren analisia (ANOVA) egin zen. Faktoreen arteko interakzioa esanguratsua izan zenean, *post-hoc* proba egin zen (Tukey datu parametrikoetarako edo Kruskal Wallis ez-parametrikoetarako). Interakziorik egon ezean, maneiuak barietate bakoitzean izandako efektua aztertzeko, datu parametrikoen kasuan faktore bateko bariantzaren analisia (ANOVA) egin zen, eta datu ez-parametrikoen kasuan Mann-Withney-ren bi lagin independenterentzako U testa. Ezberdintasun esanguratsuak asteriskoen bidez adierazi ziren (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

3.4 Nekazaritza ereduaren eragina onddo mikorriziko arbuskularren dibertsitatean

Arkautiko lursailetan, guztira 22 morfoespezie identifikatu eta 7549 espora zenbatu ziren: 21 morfoespezie eta 4866 espora lursail ekologikoan, eta 17 morfoespezie eta 2683 konbentzionalean; horietatik 16 (%72,7) amankomunekoak izan ziren, 1 (%4,5) konbentzionalean soilik eta 5 (%22,8) ekologikoan soilik aurkitu ziren. Ekologikoan landutako sailean konbentzionalean landutakoan baino morfoespezie-aberastasun handiagoa aurkitu zen ($p = 0,031$ *) eta bat dator aurretiaz beste lanetan behatutakoarekin (Säle et al., 2015; Verbruggen et al., 2010). Hala ere, gure emaitzetan ekologikoan eta konbentzionalean landutako lursailen arteko alde handia ikusten den arren, eta, aurretiaz nekazaritza ereduak espora aberastasunean eragina duela behatu bada ere (Bedini et al., 2013; Gosling et al., 2010), ez zen alde esanguratsurik antzeman, ez espora-ugaritasunean (E 1622 ± 555; K 894 ± 80; $p = 0,088$) ezta dentsitatean ere (E 39,16 ± 14,02 espora/g lur; K 20,44 ± 2,83; $p = 0,086$).

Onddo komunitateen ezaugarria da espezie gutxi batzuk ugariak diren bitartean gehienak oso urriak izatea, eta OMAen joera orokorra ere izaten da (Ares et al., 2021; Säle et al., 2015); egoera muturrekoagoa da konbentzionalean landutako lursailean: arraroak ez diren bi morfoespezieren aurrean, 5 dira lursail ekologikoan. Hartara, komunitate dibertsoagoa izatearekin lotuta egon daiteke, lehendik behatu den moduan (Bedini et al., 2013; Säle et al., 2015), Shannon-Weaver indizearen arabera, lursail ekologikoan konbentzionalean baino OMA dibertsitate handiagoa baitago ($p = 0,030$ *).

3.5 Nekazaritza ereduaren eragina babarrun barietateen mikorrizazioan

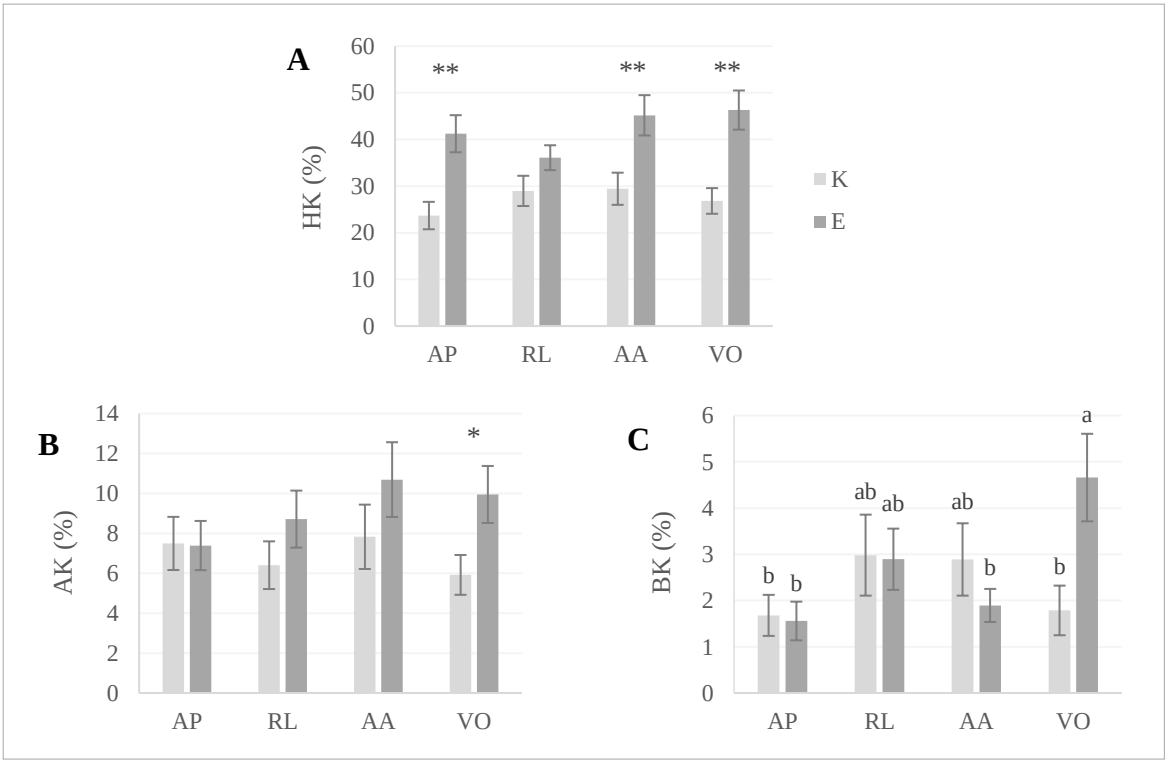
Nekazaritza ereduak zenbait onddo egituratan eragina izan zuen barietate guztiak bateratuta aztertu zirenean. Ekologikoan hazitako babarrunen hifa kolonizazioa (%42,2 ± 1,9) konbentzionalean (%27,3 ± 1,5) baino altuagoa izan zen, baita arbuskulu kolonizazioa ere (E %9,2 ± 0,7; K %6,9 ± 0,6); bien kasuan, ez zenez babarrun barietateen efektu esangarririk ezta bi faktoreen arteko interakziorik eman ere, nekazaritza ereduak barietate bakoitzaren mikorrizazioan izandako eragina aztertu zen. Barietate guztiek ez zioten mikorrizazioari berdin erantzun nekazaritza eredua aldatuz gero. Hifen kolonizazioaren portzentaiak esanguratsuki handiagoak izan ziren lursail ekologikoan hazitako Arabako lautadako barietateetan: AP, AA eta VO; ez ordea RLen kasuan (**1.irudia**, **A**). Dena den, barietate guztiek lursail ekologikoan mikorrizazio balio altuagoak izateari, lursail ekologikoan OMAen dibertsitatea handiagoa izan zela gehituz gero, lursail ekologikoan hazitako landareek aukera hobea dute mikorrizatu eta horren ondoriozko onurak jasotzeko, ura eta elikagaiak eskuratzeko, besteak beste.

Nekazaritza ereduaren eragina bestelako laboreetan ere antzeman bada ere (Banerjee et al., 2019; Bedini et al., 2013; Schneider et al., 2017), mikorrizazio-maila aztertzerakoan ez da onddo egitura bakoitza bereiztu analisiak egiteko. Mikorrizen egoera funtzionala aztertzeko, ordea, arbuskuluak eta besikulak bezalako egitura fungikoak aparte kuantifikatzea garrantzitsua izaten da (Füzy et al., 2015). Kasu horretan, barietate bakarrak erakutsi zuen arbuskuluen kolonizazio-maila esangarriki handiagoa lursail ekologikoan, hain zuzen ere VO barietateak (**1.irudia**, **B**). RL eta AA barietateen kasuan ekologikoan arbuskulu gehiago izan baziren ere, aldea ez zen esanguratsua izan. Besikulen kasuan, nekazaritza ereduaren eta barietateen arteko interakzioa behatu zen ($p = 0,022$ *), hortaz, barietateak ez ziren independenteki aztertu, baizik eta tratamendu guztiekiko. Hala ere, emaitza arbuskuluetan behatutakoarekin bat dator: nekazaritza ereduak VO barietatearen besikuletan soilik izan zuen eragin esangarria (**1.irudia**, **D**). VO barietatearen ekoizpena ez da AP eta AA beste bultzatu, eta, mikorrizazioaren ikuspegitik bere egoera funtzionala besteena baino hobea izan zela ikusita, gerta daiteke onddo mikorrizikoekiko espezifikotasun gutxiago erakustea, tradiziozko beste espezie batzuetan ikusi bezala (Parvin et al., 2021).

Sustrai mikorrizatuak tindaketa metodoaren bidez aztertuta ezinezkoa da jakitea zein edo zeintzuk onddo espezie dauden sinbiosian landare bakoitzarekin. Dena den, onddo espezie bakarrarekin egindako kontrolpeko inokulazioaren aurrean babarrun barietateek desberdin erantzuten dutela behatu da (Ibijbijen et al., 1996). Horrez gain, OMA espezie guztiek ez dituztenez besikulak eratzen, ondoriozta daiteke, gutxienez, lursail ekologikoan sinbiosia ezartzen duten onddo espezieen komunitatea desberdina izan daitekeela, eta horrelakorik antzeman da lurzoruko onddo mikorrizikoen aberastasuna teknika molekularrak erabilita aztertu

denean (Banerjee et al., 2019; Toljander et al., 2008). Bestalde, kontuan izan behar da lan honetan ez zela landareen egoera fisiologikoa aztertu eta onddo espezie guztiek ingurumen-baldintza ezberdinetan ez dituztenez onura berdinak eskaintzen (Egerton-Warburton et al., 2005), baliteke mikorrizazio portzentaietan ezberdintasunik behatu ez izan arren, harreman sinbiotiko horiek landareentzat onuragarriagoak izatea.

1. irudia. Babarrun barietateen kolonizazio ehunekoak. (**A**) Hifa kolonizazioa (HK) eta efektuak: nekazaritza eredua (NE): ***; barietatea (B): ns; interakzioa (NE*B): ns. (**B**) Arbuskulu kolonizazioa (AK) eta efektuak: NE: *; B: ns; NE*B: ns. (**C**) Besikula kolonizazioa (BK) eta efektuak: NE: ns; B: ns; NE*B *. Esangura-mailak: ns (p>0,05), * (p<0,05), ** (p<0,01), *** (p<0,001). Era berean, (**A**) eta (**B**) grafikoetan barietate bakoitzarentzat NE-ren esangura-maila *, **, *** erabilita adierazi da; (**C**) grafikoan, ordea, a eta b letrak erabili dira aztertutako taldeen arteko ezberdintasunen esangura adierazteko.



4. Ondorioak

Lan honetan, nekazaritza ereduak Neikerreko lurzoruetako OMAen dibertsitatean duen eragina ebaluatu da, baita horrek babarrun barietate desberdinen mikorrizazioan izan dezakeen eragina ere. Esporen azterketaren emaitzak ikusita, argi geratzen da lursail ekologikoak konbentzionalak baino komunitate dibertsoagoa duela eta, beraz, nekazaritza ekologikoa onddo mikorriziko arbuskularren dibertsitatea sustatzeko estrategia eraginkorra izan daitekeela. Gainera, nekazaritza ekologikoak babarrunen mikorrizazioa hobetu zuen eta, barietate guztiek antzeko balioak izan zituzten arren, batzuen mikorrizek ekologikoan egoera funtzional hobea izan zutela baieztatu zen, batez ere *Verde de Orbiso* barietateak. Dena den, kontuan izan behar da lursail esperimentalak soilik aztertuta lagin tamaina mugatua izan zela eta, emaitzak orokortu ahal izateko nekazaritza sail gehiago aztertzea komenigarria izango litzateke.

5. Etorkizunerako planteatzen den norabidea

Araban nekazaritza sail ugari daude eta sail esperimental gutxi batzuetan lortutako datuak ez dira guztientzako adierazgarriak; beraz, nekazarien lursailetan esperimentu gehiago egin beharko lirateke, bertako komunitate fungikoak eta bertan hazitako landareen mikorrizazioa aztertu ahal izateko. Bestalde, urrats berri bat ematea eta landareen sustraien mikorrizazioan parte hartzen duten espezieak identifikatzea ezinbestekoa izango da onddo mikorriziko arbuskularrek nekazaritzan izan ditzaketen onurak ulertzeko.

6. Erreferentziak

Alguacil, M. M., Torrecillas, E., García-Orenes, F., eta Roldán, A. (2014). Changes in the composition and diversity of AMF communities mediated by management practices in a Mediterranean soil are related with increases in soil biological activity. *Soil Biology and Biochemistry*, *76*, 34–44. https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2014.05.002

Ares, A., Costa, J., Joaquim, C., Pintado, D., Santos, D., Messmer, M. M., eta Mendes-Moreira, P. M. (2021). Effect of Low-Input Organic and Conventional Farming Systems on Maize Rhizosphere in Two Portuguese Open-Pollinated Varieties (OPV), "Pigarro" (Improved Landrace) and "SinPre" (a Composite Cross Population). *Frontiers in Microbiology*, *12*. https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.636009

Avio, L., Castaldini, M., Fabiani, A., Bedini, S., Sbrana, C., Turrini, A., eta Giovannetti, M. (2013). Impact of nitrogen fertilization and soil tillage on arbuscular mycorrhizal fungal communities in a Mediterranean agroecosystem. *Soil Biology and Biochemistry*, *67*, 285–294. https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2013.09.005

Banerjee, S., Walder, F., Büchi, L., Meyer, M., Held, A. Y., Gattinger, A., Keller, T., Charles, R., eta van der Heijden, M. G. A. (2019). Agricultural intensification reduces microbial network complexity and the abundance of keystone taxa in roots. *ISME Journal*, *13*(7), 1722–1736. https://doi.org/10.1038/s41396-019-0383-2

Bardgett, R. D., eta van der Putten, W. H. (2014). Belowground biodiversity and ecosystem functioning. *Nature*, *515*(7528), 505–511. https://doi.org/10.1038/nature13855

Bedini, S., Avio, L., Sbrana, C., Turrini, A., Migliorini, P., Vazzana, C., eta Giovannetti, M. (2013). Mycorrhizal activity and diversity in a long-term organic Mediterranean agroecosystem. *Biology and Fertility of Soils*, *49*(7), 781–790. https://doi.org/10.1007/s00374-012-0770-6

Bender, S. F., Wagg, C., eta van der Heijden, M. G. A. (2016). An Underground Revolution: Biodiversity and Soil Ecological Engineering for Agricultural Sustainability. *Trends in Ecology and Evolution*, *31*(6), 440–452. https://doi.org/10.1016/j.tree.2016.02.016

Brundrett, M., Bougher, N., Dell, B., Grove, T., eta Malajczuk, N. (1996). *Working with Mycorrhizas in Forestry and Agriculture*. *June 1982*, 374 pp.

Brundrett, M. C. (2009). Mycorrhizal associations and other means of nutrition of vascular plants: Understanding the global diversity of host plants by resolving conflicting information and developing reliable means of diagnosis. *Plant and Soil*, *320*(1–2), 37–77. https://doi.org/10.1007/s11104-008-9877-9

Daniels, B. A., eta Skipper, H. D. (1982). Methods for the recovery and quantitative estimation of propagules from soil. Methods and Principles of Mycorrhizal Research. In N. C. Schenck (Arg.), *The American Phytopathological Society* (or. 29–36).

de Graaff, M.-A., Hornslein, N., Throop, H. L., Kardol, P., eta van Diepen, L. T. A. (2019). Effects of agricultural intensification on soil biodiversity and implications for ecosystem functioning: A meta-analysis. In *Advances in Agronomy* (Libk. 155, or. 1–44). Academic Press Inc. https://doi.org/10.1016/bs.agron.2019.01.001

de Leon, D. G., Vahter, T., Zobel, M., Koppel, M., Edesi, L., Davison, J., Al-Quraishy, S., Hozzein, W. N., Moora, M., Oja, J., Vasar, M., eta Opik, M. (2020). Different wheat cultivars exhibit variable responses to inoculation with arbuscular mycorrhizal fungi from organic and conventional farms. *PLoS ONE*, *15*(5), 1–17. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0233878

Egerton-Warburton, L. M., Querejeta, J. I., Allen, M. F., eta Finkelman, S. L. (2005). MYCORRHIZAL FUNGI. In *Encyclopedia of Soils in the Environment* (1 (2), Libk. 4, or. 533–542). Elsevier. https://doi.org/10.1016/B0-12-348530-4/00455-0

Estaún, V., Calvet, C., eta Camprubí, A. (2010). Effect of Differences Among Crop Species and Cultivars on the Arbuscular Mycorrhizal Symbiosis. In H. Koltai eta Y. Kapulnik (Arg.), *Arbuscular Mycorrhizas: Physiology and Function*. Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-90-481-9489-6

Eusko Jaurlaritza. (2015). *Klima Aldaketaren aurkako 2050erako Euskal Estrategia*.

Eusko Jaurlaritza. (2018). *Nekazaritza zabalera, ekoizpena eta etekinak 2017*. https://www.euskadi.eus/airearen-kalitatea/-/estatistika/nekazaritza-zabalera-ekoizpena-eta-etekinak-2017/

Füzy, A., Biró, I., Kovács, R., eta Takács, T. (2015). Estimation of am fungal colonization - Comparability and reliability of classical methods. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*, *62*(4), 435–451. https://doi.org/10.1556/030.62.2015.4.8

Gholamhoseini, M., Ghalavand, A., Dolatabadian, A., Jamshidi, E., eta Khodaei-Joghan, A. (2013). Effects of arbuscular mycorrhizal inoculation on growth, yield, nutrient uptake and irrigation water productivity of sunflowers grown under drought stress. *Agricultural Water Management*, *117*, 106–114. https://doi.org/10.1016/j.agwat.2012.11.007

Giovannetti, M., Avio, L., eta Sbrana, C. (2010). Fungal spore germination and pre-symbiotic mycelial growth - Physiological and genetic aspects. In *Arbuscular Mycorrhizas: Physiology and Function* (or. 3–32). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-90-481-9489-6_1

Gosling, P., Ozaki, A., Jones, J., Turner, M., Rayns, F., eta Bending, G. D. (2010). Organic management of tilled agricultural soils results in a rapid increase in colonisation potential and spore populations of arbuscular

mycorrhizal fungi. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, *139*(1–2), 273–279. https://doi.org/10.1016/j.agee.2010.08.013

Grace, C., eta Stribley, D. P. (1991). A safer procedure for routine staining of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycological Research*, *95*(10), 1160–1162. https://doi.org/10.1016/S0953-7562(09)80005-1

Hakeem, K., Sabir, M., Ozturk, M., eta Mermut, A. R. (2014). *Soil Remediation and Plants: Prospects and Challenges*. Academic Press. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-799937-1.00019-X

Ibijbijen, J., Urquiaga, S., Ismaili, M., Alves, B. J. R., eta Boddey, R. M. (1996). Effect of arbuscular mycorrhizal fungi on growth, mineral nutrition and nitrogen fixation of three varieties of common beans (Phaseolus vulgaris). *New Phytologist*, *134*(2), 353–360. https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1996.tb04640.x

IPCC. (2014). *Climate Change 2014 Synthesis Report*.

Manoharan, L., Rosenstock, N. P., Williams, A., eta Hedlund, K. (2017). Agricultural management practices influence AMF diversity and community composition with cascading effects on plant productivity. *Applied Soil Ecology*, *115*, 53–59. https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2017.03.012

McGonigle, T. P., Miller, M. H., Evans, D. G., Fairchild, G. L., eta Swan, J. A. (1990). A new method which gives an objective measure of colonization of roots by vesicular—arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist*, *115*(3), 495–501. https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1990.tb00476.x

Moore, K., Swisher, M., Rodriguez, J., Blevins, M., Hogan, M., Hunter, L., Kelly-Begazo, C., Komar, S., Mills-Wasniak, S., eta Redhage, D. (2016). Principles Guiding Practice: A Case Study Analysis of the Principles of Sustainable Agriculture for Diverse Farms. *Journal of Agriculture, Food Systems, and Community Development*, *6*(3), 61–89. https://doi.org/10.5304/jafscd.2016.063.008

Oehl, F., Sieverding, E., Mäder, P., Dubois, D., Ineichen, K., Boller, T., eta Wiemken, A. (2004). Impact of long-term conventional and organic farming on the diversity of arbuscular mycorrhizal fungi. *Oecologia*, *138*(4), 574–583. https://doi.org/10.1007/s00442-003-1458-2

Oliveira, A. A. R., eta Sanders, F. E. (1999). Effect of management practices on mycorrhizal infection, growth and dry matter partitioning in field-grown bean. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, *34*(7), 1247–1254. https://doi.org/10.1590/S0100-204X1999000700018

Phillips, J. M., eta Hayman, D. S. (1970). Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Transactions of the British Mycological Society*, *55*(1), 158-IN18. https://doi.org/10.1016/S0007-1536(70)80110-3

Posta, K., eta Hong Duc, N. (2020). Benefits of Arbuscular Mycorrhizal Fungi Application to Crop Production under Water Scarcity. In *Drought - Detection and Solutions: Libk. i* (Zenbakia 10, or. 1–13). IntechOpen. https://doi.org/10.5772/intechopen.86595

Rillig, M. C., Sosa-Hernández, M. A., Roy, J., Aguilar-Trigueros, C. A., Vályi, K., eta Lehmann, A. (2016). Towards an integrated mycorrhizal technology: Harnessing mycorrhiza for sustainable intensification in agriculture. In *Frontiers in Plant Science* (Libk. 7, Zenbakia OCTOBER2016). Frontiers Media S.A. https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01625

Rodriguez Izagirre, D., Ortiz De Urbina, J., Groome, H., Sauca, E., eta Santiago, M. (2006). *Euskal Autonomia Erkidegoan galtzeko zorian dauden nekazaritza baliagaien prospekzioa eta haien egoeraren ebaluazioa*.

Saia, S., Amato, G., Frenda, A. S., Giambalvo, D., eta Ruisi, P. (2014). Influence of arbuscular mycorrhizae on biomass production and nitrogen fixation of berseem clover plants subjected to water stress. *PLoS ONE*, *9*(3). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0090738

Säle, V., Aguilera, P., Laczko, E., Mäder, P., Berner, A., Zihlmann, U., van der Heijden, M. G. A., eta Oehl, F. (2015). Impact of conservation tillage and organic farming on the diversity ofarbuscular mycorrhizal fungi. *Soil Biology and Biochemistry*, *84*, 38–52. https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2015.02.005

Schneider, K. D., Lynch, D. H., Bünemann, E. K., eta Voroney, R. P. (2017). Vegetative composition, arbuscular mycorrhizal fungi root colonization, and biological nitrogen fixation distinguish organic and conventional perennial forage systems. *Agronomy Journal*, *109*(4), 1697–1706. https://doi.org/10.2134/agronj2016.12.0700

Schüβler, A., Schwarzott, D., eta Walker, C. (2001). A new fungal phylum, the Glomeromycota: phylogeny and evolution*\n\t\t*Dedicated to Manfred Kluge (Technische Universität Darmstadt) on the occasion of his retirement. *Mycological Research*, *105*(12), 1413–1421. http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0953756208620262

Tahat, M. M., Alananbeh, K. M., Othman, Y. A., eta Leskovar, D. I. (2020). Soil Health and Sustainable Agriculture. *Sustainability*, *12*(12), 4859. https://doi.org/10.3390/su12124859

Toju, H., Peay, K. G., Yamamichi, M., Narisawa, K., Hiruma, K., Naito, K., Fukuda, S., Ushio, M., Nakaoka, S., Onoda, Y., Yoshida, K., Schlaeppi, K., Bai, Y., Sugiura, R., Ichihashi, Y., Minamisawa, K., eta Kiers, E. T. (2018). Core microbiomes for sustainable agroecosystems. In *Nature Plants* (Libk. 4, Zenbakia 5, or. 247–257). Palgrave Macmillan Ltd. https://doi.org/10.1038/s41477-018-0139-4

Toljander, J. F., Santos-González, J. C., Tehler, A., eta Finlay, R. D. (2008). Community analysis of arbuscular mycorrhizal fungi and bacteria in the maize mycorrhizosphere in a long-term fertilization trial. *FEMS Microbiology Ecology*, *65*(2), 323–338. https://doi.org/10.1111/J.1574-6941.2008.00512.X

Toreti, A., Bavera, D., Acosta Navarro, J., Cammalleri, C., de Jager, A., di Ciollo, C., Hrast Essenfelder, A., Maetens, W., Magni, D., Masante, D., Mazzeschi, M., Niemeyer, S., eta Spinoni, J. (2022). *Drought in Europe August 2022*. https://doi.org/10.2760/264241

Verbruggen, E., Röling, W. F. M., Gamper, H. A., Kowalchuk, G. A., Verhoef, H. A., eta van der Heijden, M. G. A. (2010). Positive effects of organic farming on below-ground mutualists: Large-scale comparison of mycorrhizal fungal communities in agricultural soils. *New Phytologist*, *186*(4), 968–979. https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2010.03230.x

7. Eskerrak eta oharrak

Eskerrak eman nahi dizkiogu Eusko Jaurlaritzari ikerketa talde bateratu gisa (AgroSosT - *Impacto del cambio climático en los agroecosistemas: estrategias de producción bajo premisas de sostenibilidad, seguridad alimentaria y conservación de la biodiversidad*, IT1682-22) ikerketarako diru laguntza eman digulako. Bestalde, Irati Ijurco-Gonzalezek UPV/EHU eskertu nahi du doktorego aurreko laguntza emateagatik (PIF21/095).

Zenbateraino eragiten diote bakterio-komunitateek esne gordineko gazten kalitateari eta kaltegabetasunari?: Idiazabal gaztaren kasua

Gorka Santamarina-García, Gustavo Amores Olazagirre, Mailo Virto Lekuona

Lactiker Ikerketa Taldea - Animalia Jatorriko Elikagaien Kalitatea eta Segurtasuna, Biokimika eta Biologia Molekularra saila, Farmazia Fakultatea, Euskal Herriko Unibertsitatea (UPV/EHU), Unibertsitate ibilbidea 7, 01006 Vitoria-Gasteiz
gorka.santamarina@ehu.eus

Laburpena

Esne gordineko gazten mikrobiota funtsezkotzat jotzen da, gaztaren kalitateari eta kaltegabetasunari eragiten diolako. Hala ere, informazio gutxi dago honen inguruan. Ikerketa honetan Idiazabal gaztaren bakterioen konposizioa heltzean zehar zelan aldatzen zen aztertu genuen eta horren erlazioa konposizio gordinarekin eta gantz-azido askeekin (GAA), kalitatearen eta aromaren aldetik; eta amina biogenikoekin (AB), toxikotasunaren ikuspuntutik. Heltzeak eta konposizio gordinaren bilakaerak bakterio azido-laktikoen nagusitzea faboratu zuen. Hauek GAAen askatzearekin erlazionatu ziren, eta gutxi batzuk, ABen sintesiarekin. Ingurumen-bakterioak eta bakterio ez-desiragarriak, aldiz, heltzean zehar inhibitu egin ziren. Hauek ABen degradazioarekin erlazionatu ziren eta GAAek hauen hazkuntza eragozten zutela behatu zen.

Hitz gakoak: gazta, mikrobiota, kalitatea, kaltegabetasuna, gantz-azido askeak, amina biogenikoak

Abstract

The microbiota of raw milk cheeses is considered essential, since it affects the quality and safety of the cheese. However, there is little information in this regard. In this study, we analysed how the bacterial composition of Idiazabal cheese changed during ripening and its relationship with gross composition and free fatty acids (FFAs), in terms of quality and aroma; and with biogenic amines (BAs), in terms of toxicity. The ripening time and the evolution of gross composition favoured the predominance of lactic acid bacteria. These were associated with the release of FFAs, and some, with the synthesis of BAs. Environmental and non-desirable bacteria, on the other hand, were inhibited during ripening. These were related to the degradation of BAs and it was observed that FFAs inhibited their growth.

Keywords: cheese, microbiota, quality, safety, free fatty acids, biogenic amines

1. Sarrera eta motibazioa

Gaztaren mikrobiotak, hau da, bakterio konposizioak, garrantzi handia du, gaztaren kalitatearekin eta kaltegabetasunarekin lotutako konposatuen eraketan parte hartzen duten erreakzio biokimiko ugaritan laguntzen baitu (Afshari et al., 2020). Lipolisia gaztaren heltzean zaporea garatzeko prozesu garrantzitsuenetako bat da. Esnearen triglizeridoen hidrolisi entzimatiko gisa definitzen da, ondoren gantz-azido askeak (GAA) askatu eta metatzea eragiten duena. GAAek zuzenean laguntzen dute gaztaren zaporean, baina konposatu aromatiko lurrunkorrak ekoizten dituzten ondorengo erreakzioetarako molekula aitzindari gisa ere jokatzen dute. Gaztaren agente lipolitiko garrantzitsuenak esne gordinaren lipoproteina lipasa, gatzagiak duen lipasa pregastrikoa eta lipasa eta esterasa mikrobianoak dira (Thierry et al., 2017). Hala ere, oso gutxi dakigu gaztaren mikrobiota eta GAAen arteko erlazioari buruz.

Elikagaien kaltegabetasunari dagokionez, bakterio-komunitateek konposatu toxikoak ere sintetiza ditzakete gaztan, non amina biogenoak (AB) nabarmentzen diren. ABak jarduera biologikoa duten pisu molekular txikiko base organiko nitrogenatu ez-lurrunkorrak dira, zeintzuk aminoazido askeen deskarboxilazio mikrobianoaren bidez sortzen diren (Spano et al., 2010). ABak ez dira kaltegarriak maila baxuetan, baina batzuek eragin toxikologikoak izan ditzakete kontzentrazio altuetan irentsi ondoren. Esnekiei eta, zehazki, gaztari dagokienez, histamina eta tiramina dira intoxikazioen eragile nagusiak. Histaminaren bidezko intoxikazioak, hipotentsio arteriala, larruazalaren narritadura edo erreakzio alergikoetan ohikoak diren larruazaleko erupzioak eragiten ditu; tiraminak, berriz, *gaztaren erreakzioa* deritzona eragiten du, hau da, migrainak, buruko minak, edo presio arteriala areagotzea. Putreszina eta kadaberina ere AB

garrantzitsuak dira, beste AB batzuen efektu toxikoa bultza dezaketelako, amina oxidasa detoxifikatzaileen inhibizioaren ondorioz; eta nitrosamina konposatu kantzerigenoen sintesiarekin lotuta daudelako (Ruiz-Capillas eta Herrero, 2019). Hartzitutako elikagaien artean, gazta ABen iturri potentzial gisa sailkatzen da, horri lotutako mikrobiotaren aktibitate handiagatik (Spano et al., 2010). Hala ere, orain arte ez da legezko mugarik ezarri ABen edukian, eta bakterioen eta ABen arteko erlazioa ez dago guztiz argi.

2. Arloko egoera eta ikerketaren helburuak

Azken urteotan hainbat lan argitaratu dira bakterio-komunitateen eta hartzitutako elikagaien kalitatearekin eta kaltegabetasunarekin lotutako konposatuen arteko harremana argitzen saiatzeko (Che et al., 2021). Hala ere, ikerketa gutxi egin dira gaztan, eta ardi-esne gordinetik eratorritako gaztei buruzko informazioa eskasa da (Cardinali et al., 2021). Izan ere, guk dakigula, azterlan bakar batek ere ez du aztertu bakterio-konposizioak heltzean izandako bilakaeraren eta konposizio gordinaren, GAAen, eta ABen bilakaeraren arteko erlazioa. Orain arte, bakterio eta konposatu jakin batzuen arteko erlazioen berri baino ez da eman, hala nola *Lactobacillus* bakterioaren eta pH-aren edo histaminaren artekoen berri (Cleide et al., 2021; Pérez Elortondo et al., 1999).

Arestian aipatutakoa kontuan hartuta, ikerketa honetan Idiazabal gaztan jarri dugu arreta. Idiazabal gazta Euskal Herriko gazta tradizional erdi gogorra edo gogorra da, latxa eta/edo karrantzar ardi arraza autoktonoen esne gordinarekin egina. Jatorrizko Deitura Babestuak arautzen du ekoizpena 1996tik (Europako Erkidegoen Aldizkari Ofiziala, 1996). Idiazabal gazta egiteko prozesua zorrotz araututa dago, eta 60 eguneko gutxieneko heltze-denbora ezartzen du (Estatuko Aldizkari Ofiziala, 1993). Hala, azterketa honen helburuak ondokoak izan dira: (1) konposizio gordina, GAAen eta ABen edukiak Idiazabal gaztaren heltze-denboran zehar nola aldatzen diren aztertzea, eta (2) aldaketa horiek bertako bakterio-komunitateekin nola erlazionatzen diren ikertzea.

3. Ikerketaren muina

Aurretik aipatutako helburuak betetzeko, Arabako, Bizkaiko eta Gipuzkoako Idiazabal Jatorri Deiturari atxikitako 4 gaztandegiren (A, B, C eta D) laguntza izan zen. Gaztandegi bakoitzeko bina gazta-lagin lortu ziren heltze-denboran zeharreko 6 puntutan, hain zuzen, 1, 7, 14, 30, 60 eta 120 egunetan. Guztira, 48 gazta lagin hartu ziren, eta hotzean (3-4 ºC) eraman ziren laborategira analisiak egiteko, hau da, mikrobiota eta horrek konposizio gordinarekin, GAAekin eta ABekin duen erlazioa aztertzeko. Datuen analisia, R (R Core Team, 2021), SPSS (26.0 bertsioa, IBM SPSS Inc., Chicago, IL, AEB) eta SIMCA (15.0.0.4783 bertsioa, Umetrics AB, Umeå, Suedia) softwareetan egin zen.

3.1 Mikrobiota

Lehendabizi, Idiazabal gaztaren bakterio konposizioa aztertu zen. Horretarako, aurretik deskribatutako metodologia jarraituz (Santamarina-García et al., 2022a), gaztetatik DNA bakterianoa erauzi zen DNeasy Blood & Tissue Kit-a (Qiagen, Valentzia, CA, AEB) erabiliz. Ondoren, 16S rRNA genearen V3-V4 zonaldeak sekuentziatu ziren MiSeq ekipo batean (Illumina Inc., San Diego, CA, AEB).

Oro har, emaitzek erakutsi zuten *Lactococcus* bakterio azido-laktikoa (BAL), gazta egiterakoan kultibo abiarazle gisa gehitutakoa, nagusia zela Idiazabal gazten heltzean zehar (% 74,9ko batez besteko ugaritasunetik egun bateko gaztetan, % 74,5ekora 120 egunetako gaztetan). Hala ere, 30 edo 60 egunetatik aurrera, haren ugaritasuna murriztu egin zen, esne gordinean aurkitzen diren beste BAL autoktono batzuk nabarmentzen hasi zirelako. Zehazki, ekoizle guztien gaztetan *Lactobacillus* generoaren ugaltzea antzeman zen (% 0,0949tik egun bateko gaztetan, % 8,96ra 120 egunetako gaztetan, batez beste). Gainerako BALen hazkuntza ekoizlearen araberakoa izan zen. A ekoizlearen gaztetan *Leuconostoc* ugaritu zen (% 4,48tik, % 31,0ra), eta A eta D ekoizleen kasuan, *Streptococcus* eta *Enterococcus* (% 0,75etik, % 4,52ra; eta % 0,675etik, % 2,12ra, genero bakoitza hurrenez hurren). Bestalde, ingurumen-bakterio edo bakterio ez-desiragarri gehienen, hau da, osasun arazoekin erlazionatutakoen ugaritasunek behera egin zuten heltzean, nahiz eta genero batzuk ugariak izan (>% 1), hots, *Obesumbacterium*, *Hafnia*, *Staphylococcus*,

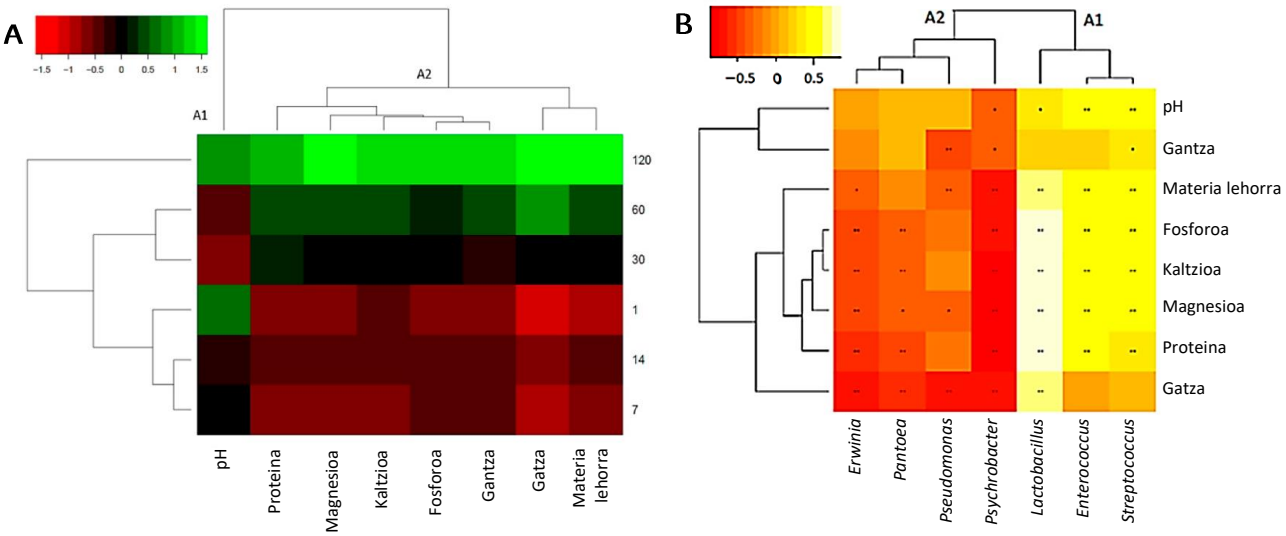
Buttiauxella, Psychrobacter, Raoultella, Serratia, Brevibacterium eta *Erwinia*. Zehazki, *Buttiauxella*ren ugaritasunak behera egin zuen heltze-prozesuan, *Staphylococcus*enak gora egin zuen, eta gainerakoek gora egin zuten heltze prozesuaren erdiko puntuetan (7, 14 edo 30 egunetako gaztetan), ondoren ugaritasunak behera eginez.

3.2 Konposizio gordina

Ondoren, gazten konposizio gordina (pH-a, materia lehorra, gantza, proteina, magnesioa, kaltzioa, fosforoa eta gatza (NaCl)) eta bakterioekin duen erlazioa aztertu zen, aurretik deskribatu den bezala (Santamarina-García et al., 2022b). pH-a pH-metro batekin neurtu zen (mikropH 2000 modeloa, Crison Instruments SA, Bartzelona, Espainia). Materia lehorraren, gantzaren, proteinen, kaltzioaren, magnesioaren eta fosforoaren edukiak, infragorri hurbileko espektrometro batekin neurtu ziren (SpectraAlyzer 2.0 FOOD, ZEUTEC GmbH, Rendsburg, Alemania). Gatz (NaCl) edukia ISO 5943 IDF 88 metodo estandarrean oinarrituta zehaztu zen, baina determinazio kolorimetrikoa erabiliz.

Orokorrean, parametro gehienen balioek goranzko joera erakutsi zuten heltze-denboran zehar (**1A. irudia,** kolore gorri argietatik geroz eta kolore berde argiagotara). Hain zuzen, materia lehorrean (% 59,5eko batez besteko ugaritasunetik egun bateko gaztetan, % 65,6kora 120 egunetako gaztetan), gantzan (%31,7tik, % 35,8ra), proteinetan (% 21,6tik, % 24,3ra), kaltzioan (5250 mg/L-tik, 6632 mg/L-ra), magnesioan (330 mg/L-tik, 440 mg/L-ra), fosforoan (436 mg/L-tik 544 mg/L-ra) eta gatzaren edukian (% 0,625tik, % 2,18ra) ($P \leq 0,01$). Aldiz, pH-ak joera ezberdina aurkeztu zuen, balio baxuenak 30 egunetan lortuz (4,91 ± 0,14), eta, ondoren, 120 egunetara arte, gora eginez eta hasierako balioak berreskuratuz (5,11 ± 0,14) ($P \leq 0,05$). Emaitza hauek bat datoz Idiazabal gaztaren inguruan aurretik argitaratutako lanekin (Aldalur et al., 2019; Etayo et al., 2006; Pérez Elortondo et al., 1999). Hala ere, ezberdintasun nabariak existitzen dira beste ardi-esne gordineko gaztekin alderatuta (De Pasquale et al., 2019).

1. irudia. Konposizio gordinaren eboluzioaren bero-mapa (A) eta bakterioekiko erlazioa (B). Korrelazio esanguratsuak ** $P \leq 0,01$ eta * $P \leq 0,05$ bidez adierazten dira



Gaztaren bakterioen eta konposizio gordinaren arteko erlazioa bi noranzkoko karratu partzial minimo ortogonalen (O2PLS) eta Spearmanen korrelazioen arteko analisi baten bidez aztertu zen. Horrela, zazpi bakterio-genero identifikatu ziren konposizio gordinaren bilakaerarekin lotuta zeudenak, hots, *Lactobacillus, Psychrobacter, Erwinia, Enterococcus, Pseudomonas, Pantoea* eta *Streptococcus* (**1B. irudia**). Bakterio horiek bi taldetan banatzen ziren: konposizio gordinaren parametroekin korrelazio positiboa izan zuten BALak (A1) eta negatiboki erlazionatu ziren ingurumen-bakterioak edo desiragarriak ez direnak (A2). BALen barruan, *Lactobacillus*ek korrelazio positibo handienak erakutsi zituen, batez ere proteinen ($\rho = 0,842$), kaltzioaren ($\rho = 0,809$), fosforoaren ($\rho = 0,805$) eta magnesioaren edukiekin ($\rho = 0,781$) ($P \leq 0,01$). Bestalde, ingurune-bakterioek eta ez-desiragarriek korrelazio negatibo ugari izan zituzten. Orokorrean,

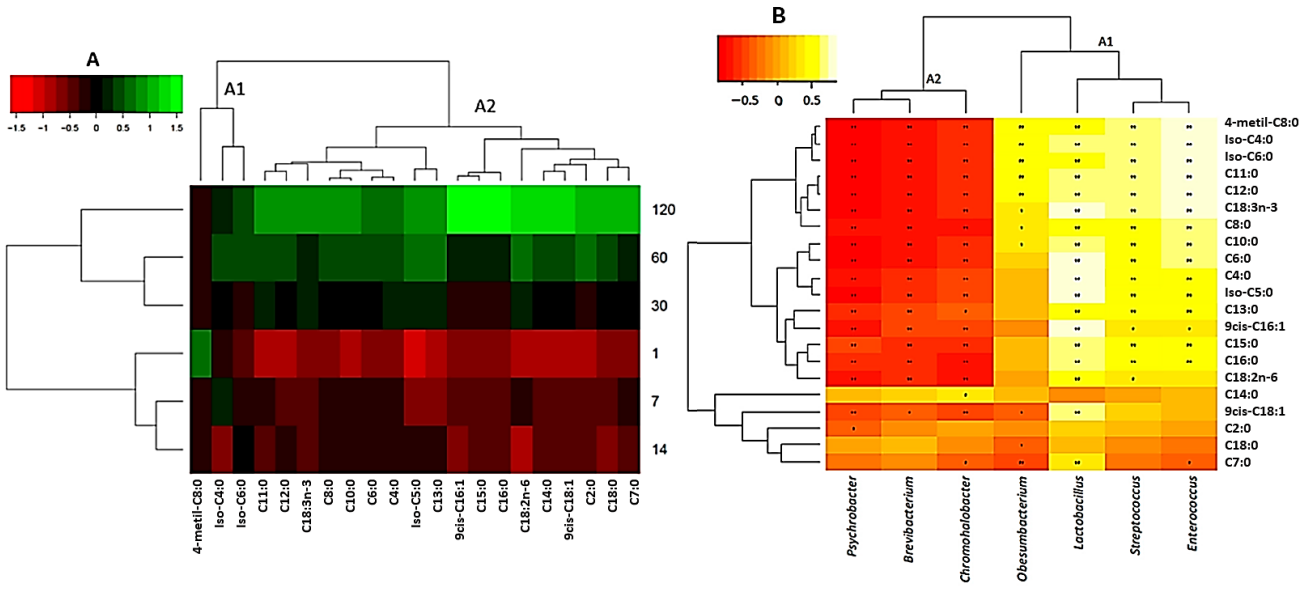
Psychrobacter izan zen korrelazio negatiboenak erakutsi zitueneko bakterioa, batez ere, proteinen ($\rho = -0{,}762$), kaltzioaren ($\rho = -0{,}750$), magnesioaren ($\rho = -0{,}747$), fosforoaren ($\rho = -0{,}718$) eta materia lehorraren edukiekin ($\rho = -0{,}705$) ($P \leq 0{,}01$). Hortaz, emaitzek iradokitzen dutenez, konposizio gordinaren bilakaerak heltzean zehar BALen ugaltzea faboratzen du, eta ingurumen-bakterioen edo bakterio ez-desiragarrien hazkundea, aldiz, murriztu edo inhibitu egiten da. Emaitzak bat datoz aurretik argitaratutako beste emaitza batzuekin. Adibidez, *Suan zuo rou* haragi hartzituaren kasuan, Wang et al.-ek (2021) *Lactobacillus*en eta pH-aren eta gatz edukiaren arteko korrelazio positiboa jakinarazi dute, eta pH-aren eta *Psychrobacter* bakterioaren arteko erlazio negatiboa.

3.3 GAAak

Mikrobiotak Idiazabal gaztaren kalitatean eta, bereziki, aroman duen eragina aztertzeko, GAAak aztertu ziren, aurretik deskribatu den moduan (Santamarina-García et al., 2022b). Hain zuzen, GAAk gas-likido kromatografia bidez identifikatu eta kuantifikatu ziren (7890 Serie II gas-kromatografoa erabiliz, sugarraren bidezko ionizazio-detektagailua eta FFAP zutabe kapilar bat duena (25 m-ko luzera, 0,32 mm-ko barne-diametroa, 0,50 µm-ko lodiera) (Agilent Technologies, Madril, Espainia)).

Oro har, GAAen kontzentrazioak ere handitu egin ziren heltze-denboran zehar ($P \leq 0{,}01$) (**2A. irudia**, kolore gorri argietatik geroz eta kolore berde argiagotara). GAA totalen kontzentrazioa 12,0 ± 5,95 µmol/g-tik (batez beste egun bateko gaztetan) 49,9 ± 24,5 µmol/g-ra (120 egunetako gaztetan) aldatu zen, GAA aseak eta kate laburrekoak nagusituz. Guztira, 21 GAA identifikatu ziren, ugarienak C2:0 (20,8 µmol/g batez beste 120 egunetako gaztetan), C4:0 (13,0 µmol/g), C6:0 (3,54 µmol/g) eta C10:0 (2,81 µmol/g) izanik. GAA guztien kontzentrazioak nabarmen igo ziren heltzean zehar, iso-C4:0, iso-C6:0 eta 4-metil-C8:0-renak izan ezik ($P > 0{,}05$). Emaitzak bat datoz Idiazabal gaztaren aurreko azterketekin (Hernández et al., 2009). Hala ere, aipatu beharra dago 4-metil-C8:0, iso-C4:0 eta iso-C6:0 aurreneko aldiz identifikatu direla Idiazabal gaztan. Heltzean zehar ematen den lipolisi-prozesuan edo nagusitzen diren GAAetan ezberdintasunak daude ardi-esne gordinetik eratorritako beste gazta batzuekin alderatuz gero. Adibidez, Kope gaztan kate luzeko GAAk nagusitzen dira (Esmaeilzadeh et al., 2021).

2. irudia. GAAen eboluzioaren bero-mapa (A) eta bakterioekiko erlazioa (B). Korrelazio esanguratsuak ** $P \leq 0{,}01$ eta * $P \leq 0{,}05$ bidez adierazten dira.



Mikrobiotak GAAen bilakaerarekin duen erlazioari dagokionez (**2B. irudia**), zazpi bakterio-genero identifikatu ziren erlazionatuta zeudenak, hain zuzen, *Psychrobacter*, *Brevibacterium*, *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Chromohalobacter*, *Streptococcus* eta *Obesumbacterium*. Bakterio

horiek bi taldetan banatu ziren: alde batetik, BALak eta *Obesumbacterium* ingurumen-bakterioa, zeintzuek korrelazio positiboak izan baitzituzten GAAekin; eta bestetik, GAAekin negatiboki erlazionatu ziren ingurumen-bakterio eta bakterio ez-desiragarriak. BALen barruan, korrelazio handienak *Lactobacillus* eta *Enterococcus* generoek izan zituzten. *Lactobacillus*ek korrelazio indartsuenak C7:0rekin ($\rho = 0,718$) eta kate ertain eta luzeko GAAekin izan zituen, esaterako, C14:0rekin ($\rho = 0,745$) ($P \leq 0,01$). *Enterococus*ek, aldiz, korrelazio handiak izan zituen kate laburreko GAAekin, hala nola C4:0rekin ($\rho = 0,819$) eta C6:0rekin ($\rho = 0,800$) ($P \leq 0,01$). Lipasa eta esterasa mikrobianoak, zeintzuek GAAen askapena eragiten duten, agente lipolitiko garrantzitsutzat jotzen dira gaztan (Thierry et al., 2017). Lortutako emaitzek adierazten dute *Lactobacillus*, *Enterococcus* eta neurri txikiagoan *Streptococcus* BALak, bakterio lipolitiko garrantzitsuak direla Idiazabal gaztan. Hori oso garrantzitsua da, askatutako GAA gehienek Idiazabal gaztaren aroman eragiten dutelako (Hernández et al., 2009). Ingurumen-bakterio eta bakterio ez-desiragarrien barruan, *Obesumbacterium*ek korrelazio positiboak izan zituen kate laburreko GAAekin, hala nola C4:0rekin ($\rho = 0,534$) eta C6:0rekin ($\rho = 0,502$) ($P \leq 0,01$). Hortaz, emaitzek *Obesumbacterium* bakterioaren jarduera lipolitiko interesgarria adierazten dute, orain arte deskribatu ez dena. Horrek zentzua izango luke, beste ingurumen- edo desiragarriak ez diren zenbait bakterioentzat deskribatu delako, hala nola *Pseudomonas*enzat (Ozturkoglu-Budak et al., 2016). Gainerako ingurumen-bakterioek eta bakterio ez-desiragarriek, berriz, korrelazio negatiboak izan zituzten, eta lotura negatiboenak *Psychrobacter*rek erakutsi zituen, esaterako, C4:0rekin ($\rho = -0,759$) edo C6:0rekin ($\rho = -0,765$) ($P \leq 0,01$). GAAek espektro zabaleko agente antimikrobiano gisa jardun dezaketela iradoki da, peptido antimikrobianoekin aldera daitezkeenak (Yoon et al., 2018). Beraz, lortutako emaitzek adieraz lezakete Idiazabal gaztan GAAen askatzea bakterioen arteko lehia-inhibizioko mekanismoen parte izan daitekeela. BALak izan litezke GAAak askatzeaz arduratzen diren bakterio-genero nagusiak, eta ingurumen-bakterioen eta desiragarriak ez direnen aurkako inhibizio-efektua izan dezakete.

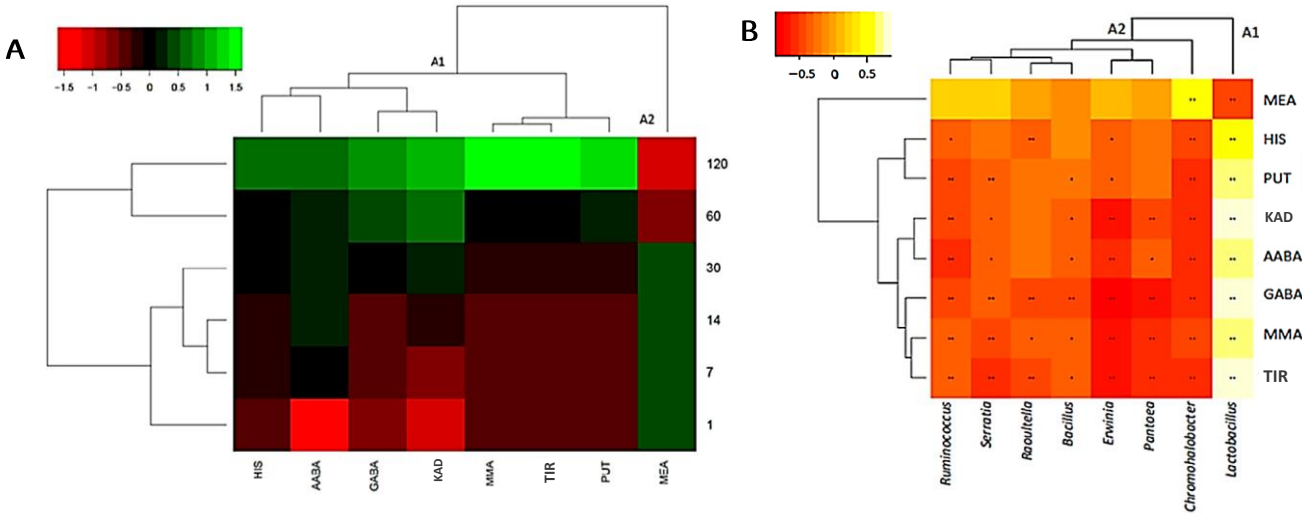
3.4 ABak

Idiazabal gaztaren ABak, aurretik deskribatutako eran analizatu ziren (Santamarina-García et al., 2022b). Alderantzizko faseko bereizmen handiko kromatografia likidoaren bidez identifikatu eta kuantifikatu ziren ABak (fluoreszentzia-detektagailua (Waters, Bartzelona, Espainia) duen Alliance 2690 ekipo batean, XTerraTM MS C18 zutabearekin (25 Å-eko poro-tamaina, 5 µm-ko partikula-tamaina, 4,6 mm-ko barne-diametroa eta 250 mm-ko luzera)).

Guztira, 8 AB baino ez ziren detektatu heltzean zehar, zehazki, azido α-aminobutirikoa, azido γ-aminobutirikoa, kadaberina, histamina, etanolamina, metilamina, putreszina eta tiramina (**3A. irudia**). ABen kontzentrazioa, batez beste, 4,29 ± 0,375 µmol/g-tik (egun bateko gaztetan), 14,9 ± 3,73 µmol/g-ra (120 egunetako gaztetan) aldatu zen ($P \leq 0,001$). Banakako AB gehienen kontzentrazioek gora egin zuten heltzean (A1 taldea). Ugariena metilamina izan zen (3,16 ± 0,323 µmol/g batez beste 120 egunetako gaztetan) eta ondoren, putreszina (2,72 ± 1,39 µmol/g), kadaberina (2,58 ± 0,380 µmol/g) eta azido γ-aminobutirikoa (2,35 ± 1,12 µmol/g). Emaitza hauek bat datoz, partzialki, Idiazabal gaztari (Ordóñez et al., 1997) eta ardi-esne gordinetik eratorritako beste gazta batzuei buruz argitaratutakoarekin (Tofalo et al., 2019), aldeak baitaude identifikatutako ABetan eta heltzean duten bilakaeran. Adibidez, Ordóñez et al.-ek (1997) isopentilamina eta espermidina topatu dituzte Idiazabal gaztan, ikerketa honetan detektatu ez direnak, eta Tofalo et al.-ek (2019) ez dute histamina identifikatu Pecorino di Farindola gaztan. Detektatutako AB nagusien artean, metilamina abereentzat kaltegarri gisa deskribatu da kontzentrazio handietan (Mao et al., 2017). Putreszina eta kadaberina oso ezagunak diren AB toxikoak dira. Hala ere, oro har, gaztan toxikotzat jotzen diren mugen azpitik daude (Özogul & Özogul, 2020). Azkenik, azido γ-aminobutirikoaren nagusitasuna bereziki interesgarria da osasunerako eragin onuragarri ugari dituelako, hala nola depresioan (Boonstra et al., 2015) edo minbizian (Wang et al., 2016). Nabarmentzekoa da espermidina eta espermina ez zirela detektatu, animalia, landare edo mikroorganismoek berez sortutako AB endogenoak direnak (Ruiz-Capillas & Herrero, 2019). Hortaz, gaztan topatzen zireneko ABak mikrobiotaren deskarboxilazio erreakzioen ondorio ziren.

Zortzi bakterio-genero identifikatu ziren ABen bilakaerarekin lotutako funtsezko bakterio gisa: *Lactobacillus*, *Erwinia*, *Chromohalobacter*, *Pantoea*, *Bacillus*, *Ruminococcus*, *Serratia* eta *Raoultella* (**3B. irudia**). *Lactobacillus* izan zen korrelazio positibo gehien zitueneko bakterioa (A1), negatiboki erlazionatu ziren gainerakoetatik bereizita (A2). *Lactobacillus*ek oso korrelazio handiak izan zituen tiraminaren (ρ = 0,865), azido γ-aminobutirikoaren (ρ = 0,840) eta kadaberinaren kontzentrazioekin (ρ = 0,752) ($P \leq 0,01$). Ingurumen-bakterio eta bakterio ez-desiragarrien artean, *Chromohalobacter*rek korrelazio positibo handia izan zuen etanolaminarekin (ρ = 0,625) ($P \leq 0,01$) eta gainerakoek korrelazio negatiboak baino ez zituzten erakutsi. *Erwinia* izan zen erlazio negatiboenak erakutsi zituena, batez ere azido γ-aminobutirikoarekin (ρ = –0,768), metilaminarekin (ρ = –0,651), kadaberinarekin (ρ = –0,643) eta tiraminarekin (ρ = –0,635) ($P \leq 0,01$). BAL abiarazleak, BAL autoktonoak eta beste mikroorganismo batzuk deskarboxilasak sintetizatzen dituzten bakterioak direla adierazi da (Tittarelli et al., 2019), eta hori, *Lactobacillus acidophilus* andui batzuetarako frogatu da (Rodríguez-Sánchez et al., 2021). Izan ere, hartzitutako beste elikagai batzuetan, *Lactobacillus*en eta AB ezberdinen arteko korrelazio positiboak ere jakinarazi dira, hala nola tiramina, putreszina edo histaminarekin hautemandakoak (Zhang et al., 2021). Horrek *Lactobacillus* bakterio-generoa Idiazabal gaztaren AB-ekoizle nagusia dela baieztatuko luke. Era berean, *Chromohalobacter* bakterioaren kasuan, Jung et al.-ek (2015) jakinarazi dute korrelazio positiboa topatu dutela putreszinarekin, genero horren deskarboxilasa jardueraren alde egingo lukeena. Hala ere, ez da aurkitu etanolaminaren sintesiarekin lotutako informaziorik. Erlazio negatiboei dagokienez, gaztarentzat ez bada ere, beste produktu hartzitu batzuentzako korrelazio negatiboak ere jakinarazi dira, adibidez, *Erwinia*ren eta histaminaren artean eskabetxeko ziape tuberkuluen hartzidura espontaneoan (Zhang et al., 2021). Horrek bakterioek ABak degradatzeko duten gaitasuna adieraziko luke, nahiz eta oraingoz *Lactobacillus* eta *Bacillus* bakterioentzat soilik frogatu den (Butor et al., 2017).

3. irudia. ABen eboluzioaren bero-mapa (A) eta bakterioekiko erlazioa (B).
Korrelazio esanguratsuak ** $P \leq 0,01$ eta * $P \leq 0,05$ bidez adierazten dira. Laburdurak: α-aminobutirikoa (AABA), azido γ-aminobutirikoa (GABA), kadaberina (KAD), histamina (HIS), etanolamina (MEA), metilamina (MMA), putreszina (PUT) eta tiramina (TIR).



4. Ondorioak

Oro har, ondoriozta daiteke ikerketa honen bidez oso emaitza berritzaileak lortu direla. Orain arte, informazio gutxi zegoen esne gordineko gazten mikrobiotak kalitate eta segurtasun parametro ezberdinetan zein neurritan eragiten duen jakiteko. Konposizio gordinaren bilakaerak heltzean zehar bakterio-konposizioa modulatzen duela frogatu dugu. Gainera, egiaztatu dugu mikrobiota GAAen ekoizpenarekin erlazionatuta dagoela, zeintzuek gaztaren aromari eragiten dioten, baita ABen sintesiarekin ere, gehienak toxikoak izan daitezkeenak. Era berean, hainbat erlazio negatibo ikusi dira, GAAen efektu antibakterianoa eta bakterioek ABak degradatzeko duten ahalmena adieraz ditzaketenak.

5. Etorkizunerako planteatzen den norabidea

Etorkizuneko ikerketetarako, interesgarria izango litzateke gaztaren mikrobiotan eragina duten baldintzak (elaborazio-tenperaturak edo pH-ak, adibidez) edo praktikak (artaldearen elikadura) aztertzea, elikagaien kalitateari eta kaltegabetasunari dagokionez, mikrobiotarik onena hautatzeko. Gainera, interesgarria izango da mikrobiotak elikagaien kalitate- eta segurtasun-parametro gehiagorekin duen harremana aztertzea, konposatu lurrunkorrekin esaterako.

6. Erreferentziak

Afshari, R., Pillidge, C. J., Read, E., Rochfort, S., Dias, D. A., Osborn, A. M., & Gill, H. (2020). New insights into cheddar cheese microbiota-metabolome relationships revealed by integrative analysis of multi-omics data. *Scientific Reports*, *10*(1), 1–13. https://doi.org/10.1038/s41598-020-59617-9

Aldalur, A., Bustamante, M. Á., & Barron, L. J. R. (2019). Effects of technological settings on yield, curd, whey, and cheese composition during the cheese-making process from raw sheep milk in small rural dairies: Emphasis on cutting and cooking conditions. *Journal of Dairy Science*, *102*(9), 7813–7825. https://doi.org/10.3168/JDS.2019-16401

Boonstra, E., de Kleijn, R., Colzato, L. S., Alkemade, A., Forstmann, B. U., & Nieuwenhuis, S. (2015). Neurotransmitters as food supplements: The effects of GABA on brain and behavior. *Frontiers in Psychology*, *6*, 1520. https://doi.org/10.3389/fpsyg.2015.01520

Butor, I., Pištěková, H., Purevdorj, K., Jančová, P., Buňka, F., & Buňková, L. (2017). Biogenic amines degradation by microorganisms isolated from cheese. *Potravinarstvo Slovak Journal of Food Sciences*, *11*(1), 302–308. https://doi.org/10.5219/736

Cardinali, F., Ferrocino, I., Milanović, V., Belleggia, L., Corvaglia, M. R., Garofalo, C., Foligni, R., Mannozzi, C., Mozzon, M., Cocolin, L., Osimani, A., & Aquilanti, L. (2021). Microbial communities and volatile profile of Queijo de Azeitão PDO cheese, a traditional Mediterranean thistle-curdled cheese from Portugal. *Food Research International*, *147*, 110537. https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2021.110537

Che, H., Yu, J., Sun, J., Lu, K., & Xie, W. (2021). Bacterial composition changes and volatile compounds during the fermentation of shrimp paste: Dynamic changes of microbial communities and flavor composition. *Food Bioscience*, *43*, 101169. https://doi.org/10.1016/j.fbio.2021.101169

Cleide, C. O., Castro-Mejía, J. L., Krych, L., & Rattray, F. P. (2021). Histamine-forming ability of Lentilactobacillus parabuchneri in reduced salt Cheddar cheese. *Food Microbiology*, *98*, 103789. https://doi.org/10.1016/J.FM.2021.103789

De Pasquale, I., Di Cagno, R., Buchin, S., De Angelis, M., & Gobbetti, M. (2019). Use of autochthonous mesophilic lactic acid bacteria as starter cultures for making Pecorino Crotonese cheese: Effect on compositional, microbiological and biochemical attributes. *Food Research International*, *116*, 1344–1356. https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2018.10.024

Esmaeilzadeh, P., Ehsani, M. R., Mizani, M., & Givianrad, M. H. (2021). Characterization of a traditional ripened cheese, Kurdish Kope: Lipolysis, lactate metabolism, the release profile of volatile compounds, and correlations with sensory characteristics. *Journal of Food Science*, *86*(8), 3303–3321. https://doi.org/10.1111/1750-3841.15830

Etayo, I., Pérez Elortondo, F. J., Gil, P. F., Albisu, M., Virto, M., Conde, S., Rodriguez Barron, L. J., Nájera, A. I., Gómez-Hidalgo, M. E., Delgado, C., Guerra, A., & De Renobales, M. (2006). Hygienic quality, lipolysis and sensory properties of Spanish Protected Designation of Origin ewe's milk cheeses manufactured with lamb rennet paste. *Lait*, *86*(6), 415–434. https://doi.org/10.1051/lait:2006021

Hernández, I., Barrón, L. J. R., Virto, M., Pérez-Elortondo, F. J., Flanagan, C., Rozas, U., Nájera, A. I., Albisu, M., Vicente, M. S., & de Renobales, M. (2009). Lipolysis, proteolysis and sensory properties of ewe's raw milk cheese (Idiazabal) made with lipase addition. *Food Chemistry*, *116*(1), 158–166. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.02.026

Jung, J. Y., Chun, B. H., & Jeon, C. O. (2015). Chromohalobacter is a causing agent for the production of organic acids and putrescine during fermentation of ganjang, a korean traditional soy sauce. *Journal of Food Science*, *80*(12), M2853–M2859. https://doi.org/10.1111/1750-3841.13114

Mao, S., Huo, W., Liu, J., Zhang, R., & Zhu, W. (2017). In vitro effects of sodium bicarbonate buffer on rumen fermentation, levels of lipopolysaccharide and biogenic amine, and composition of rumen microbiota. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *97*(4), 1276–1285. https://doi.org/10.1002/JSFA.7861

Ordóñez, A. I., Ibáñez, F. C., Torre, P., & Barcina, Y. (1997). Formation of biogenic amines in Idiazabal ewe's-milk cheese: Effect of ripening, pasteurization, and starter. *Journal of Food Protection*, *60*(11), 1371–1375. https://doi.org/10.4315/0362-028X-60.11.1371

Özogul, Y.; Özogul, F (2020). Chapter 1: Biogenic Amines Formation, Toxicity, Regulations in Food. In Saad, B., Tofalo, R. (Eds.), *Food Chemistry, Function and Analysis* (pp. 1–17). Royal Society of Chemistry. https://doi.org/10.1039/9781788015813-00001

Ozturkoglu-Budak, S., Wiebenga, A., Bron, P. A., & de Vries, R. P. (2016). Protease and lipase activities of fungal and bacterial strains derived from an artisanal raw ewe's milk cheese. *International Journal of Food Microbiology*, *237*, 17–27. https://doi.org/10.1016/J.IJFOODMICRO.2016.08.007

Pérez Elortondo, F. J., Albisu, M., & Barcina, Y. (1999). Brining time effect on physicochemical and microbiological parameters in Idiazabal cheese. *International Journal of Food Microbiology*, *49*(3), 139–149. https://doi.org/10.1016/S0168-1605(99)00068-9

R Core Team. (2021). *R: The R Project for Statistical Computing*. R Foundation for Statistical Computing. https://www.r-project.org/

Rodríguez-Sánchez, S., Ramos, I. M., Seseña, S., Poveda, J. M., & Palop, M. L. (2021). Potential of Lactobacillus strains for health-promotion and flavouring of fermented dairy foods. *LWT*, *143*, 111102. https://doi.org/10.1016/J.LWT.2021.111102

Ruiz-Capillas, C., & Herrero, A. M. (2019). Impact of Biogenic Amines on Food Quality and Safety. *Foods*, *8*(2), 62. https://doi.org/10.3390/FOODS8020062

Santamarina-García, G., Hernández, I., Amores, G., & Virto, M. (2022a). Characterization of Microbial Shifts during the Production and Ripening of Raw Ewe Milk-Derived Idiazabal Cheese by High-Throughput Sequencing. *Biology*, *11*(5), 769. https://doi.org/10.3390/BIOLOGY11050769

Santamarina-García, G., Amores, G., López de Armentia, E., Hernández, I., & Virto, M. (2022b). Relationship between the Dynamics of Gross Composition, Free Fatty Acids and Biogenic Amines, and Microbial Shifts during the Ripening of Raw Ewe Milk-Derived Idiazabal Cheese. *Animals*, *12*(22), 3224. https://doi.org/10.3390/ani12223224

Spano, G., Russo, P., Lonvaud-Funel, A., Lucas, P., Alexandre, H., Grandvalet, C., Coton, E., Coton, M., Barnavon, L., Bach, B., Rattray, F., Bunte, A., Magni, C., Ladero, V., Alvarez, M., Fernández, M., Lopez, P., de Palencia, P. F., Corbi, A., … Lolkema, J. S. (2010). Biogenic amines in fermented foods. *European Journal of Clinical Nutrition*, *64*(3), S95–S100. https://doi.org/10.1038/ejcn.2010.218

Thierry, A., Collins, Y. F., Mukdsi, M. C. A. McSweeney, P. L. H., & Wilkinson, M. G. Spinnler, H. E. (2017). Lipolysis and metabolism of fatty acids in cheese. In P. L. H. McSweeney, P. F. Fox, P. D. Cotter, & D. W. Everett (Eds.), *Cheese: chemistry, physics, and microbiology* (4th ed., pp. 423– 444). Academic Press.

Tittarelli, F., Perpetuini, G., Di Gianvito, P., & Tofalo, R. (2019). Biogenic amines producing and degrading bacteria: A snapshot from raw ewes' cheese. *LWT*, *101*, 1–9. https://doi.org/10.1016/J.LWT.2018.11.030

Tofalo, R., Perpetuini, G., Battistelli, N., Pepe, A., Ianni, A., Martino, G., & Suzzi, G. (2019). Accumulation γ-aminobutyric acid and biogenic amines in a traditional raw milk ewe's cheese. *Foods*, *8*(9), 401. https://doi.org/10.3390/foods8090401

Wang, C., Zhu, C. L., Huang, Z. J., Wang, G., Huang, Q., Liu, C. H., Xie, F., & Wang, W. (2016). γ-aminobutyric acid inhibits the growth of cholangiocarcinoma via cAMP/PKA signal pathway. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, *9*(6), 9992–9998.

Wang, H., Su, W., Mu, Y., & Zhao, C. (2021). Correlation Between Microbial Diversity and Volatile Flavor Compounds of Suan zuo rou, a Fermented Meat Product From Guizhou, China. *Frontiers in Microbiology*, *12*, 3216. https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.736525

Yoon, B. K., Jackman, J. A., Valle-González, E. R., & Cho, N.-J. (2018). Antibacterial Free Fatty Acids and Monoglycerides: Biological Activities, Experimental Testing, and Therapeutic Applications. *International Journal of Molecular Sciences*, *19*(4). https://doi.org/10.3390/IJMS19041114

Zhang, C., Zhang, J., & Liu, D. (2021). Biochemical changes and microbial community dynamics during spontaneous fermentation of Zhacai, a traditional pickled mustard tuber from China. *International Journal of Food Microbiology*, *347*, 109199. https://doi.org/10.1016/J.IJFOODMICRO.2021.109199

7. Eskerrak eta oharrak

Lan hau G. Santamarina-García garatzen ari den doktorego-tesiaren parte da eta nazioartean garrantzia duten aldizkari ezberdinetan argitaratu da, hala nola, *Biology*-n eta *Animals*-en. Egileek eskerrak eman nahi dizkiete Idiazabal JIBari atxikitako gaztagileei ikerketa honetan parte hartzeagatik, baita SGIker zerbitzuari (UPV/EHU) emandako laguntza teknikoagatik ere. Ikerketa hau burutzeko dirulaguntza Eusko Jaurlaritzak eman zuen (Gasteiz, IT944-16). Gorka Santamarina-Garcíak eskerrak eman nahi dizkio Euskal Herriko Unibertsitateari doktorego aurreko kontratuagatik.

Silizezko nanopartikulen egituraren analisia espektroskopia infragorriaren bidez

Mireia Sainz-Menchón[1]; Iñigo Gonzalez de Arrieta[1,2], Gabriel Alejandro López[1]

[1] Fisika Saila. UPV/EHU. Sarriena auzoa z/g, E-48940 Leioa.
[2] CNRS, CEMHTI UPR3079, Univ. Orléans, F-45071 Orléans, Frantzia.

mireia.sainz@ehu.eus

Laburpena

Material amorfoen arloan nanomaterial beirakaren inguruko ikerketak ardatz nagusietako bat osatzen du. Material horien propietate optikoak eta egitura molekularra aztertzeko, erabilgarria suertatzen da erreflektantzia infragorriko neurketak burutzea, izaera kualitatiboa izan ohi dutenak. Silizearen sare amorfoan rol garrantzitsua jokatzen dute Q_3 eta Q_4 izeneko egitura molekular tetraedrikoek, sarearen konektibitatea zehazten dute-eta, materialaren propietateetan eragiten duena. Hori dela eta, lan honetan erreflektantzia espektroskopian oinarritutako silize nanopartikulen Q_3 eta Q_4 egituren populazioa kalkulatzeko metodo kuantitatiboa aurkeztuko da. Emaitzak erresonantzia magnetiko nuklear esperimentuan lorturikoekin parekatuko dira horien baliozkotasuna egiaztatzeko.

Hitz gakoak: espektroskopia infragorria, sol-gel silizea, nanobeirak, erresonantzia magnetiko nuklearra

Abstract

The investigation of glassy nanomaterials is one of the main axes of amorphous material research. For the characterization of the optical properties and molecular structure of these materials, infrared reflectance measurements are useful. These analyses, however, are qualitative in character. Tetrahedral molecular structures known as Q_3 and Q_4 play an important role in the silica amorphous network, as they determine the topology of the network, which influences the properties of the material. Therefore, the purpose of this study is to offer a quantitative technique based on reflectance experiments for estimating the population of Q_4 and Q_3 structures in silica nanoparticles. To ensure their validity, the results were compared to those acquired by nuclear magnetic resonance spectroscopy.

Keywords: *infrared spectroscopy, sol-gel silica, nanoglasses, nuclear magnetic resonance*

1 Sarrera eta motibazioa

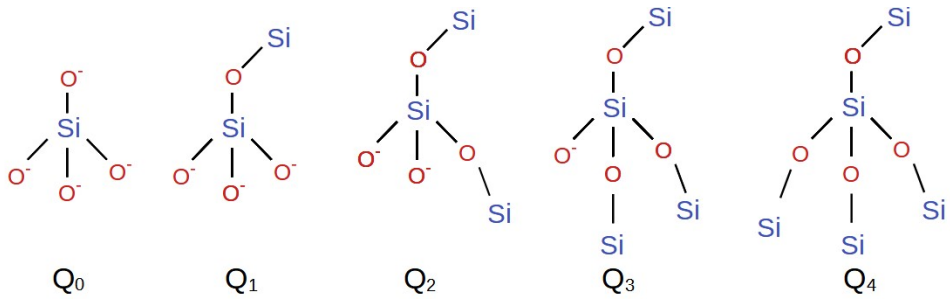
Azken hamarkadetan asko garatu da nanomaterial beirakaren inguruko ikerketa, material amorfoen alorrean aurrerapen garrantzitsu eta nabarmenak eragin dituena. Urteetan zehar sortu diren sintesi-teknika ugariek bultzatua izan da hori, teknika horiek bidea ireki baitute itxura eta konposizio anitzezko nanomaterialak fabrikatzeko: nanopartikulak, nanozuntzak, nanohariak, edota nanogeruzak, adibidez. Nanomaterialen eta horien baliokide makroskopikoen propietateek desberdintasunak izan ohi dituzte, eta ezberdintasun horiek dira, hain zuzen, nanomaterialen inguruko interesa piztu dutena. Propietate optikoen kasuan zehazki, nanomaterialen morfologia ,edota sakabanaketa aldatuz materialaren izaera optikoa eraldatu eta doitu daiteke, materiala aplikazio optikoetara moldatzea ahalbidetzen duena.

Nanomaterial beirakarak garatzeko erabiltzen den oxido ohikoenetako bat silizio dioxidoa edo silizea (SiO_2) da, zeinetan silizio atomo bat lau oxigeno atomoekin lotzen den tetraedro bat osatuz. Tetraedro horiek sare kristalinoan antolatzen badira, kuartzoa lortzen da; ordenarik gabeko sarea eratzen badute, ordea, beira (silizearen forma amorfoa, aplikazio industrial ugari dituena). Zientziaren arlo ezberdinetan bilakatu dira erakargarri silize amorfozko nanopartikulak (NP), alde batetik, horien morfologia eta tamaina modu errazean kontrolatu daitezkeelako, eta bestetik, toxikoak ez direlako. Abantaila horiek direla eta, esparru oso ezberdinetan topatu ditzakegu nanopartikula hauek, hala nola elektronikan, katalisian, eraikuntza-materialean ,edota biomedikuntzan (Fu et al., 2022; Singh

et al., 2011; Steinbach et al., 2022; Varshney et al., 2022; Singh et al., 2014).

Silize amorfoa osatzen duen sarearen egitura irregularra eta konplexua da. Sare horretan, aurretiaz esan moduan, silizio atomoak oxigeno atomoen bidez elkarri lotzen dira. Silizio tetraedro bakoitzak egitura-unitate bat osatzen du, Q_n deritzoguna, non $n \in$ [0,4] den silizioak loturik dituen beste egitura-unitate kopuruaren arabera, alegia, oxigenoen bitartez loturik dituen beste silizio-atomo kopuruaren arabera (ikus 1 Irudia).

1. Irudia: Q_n $n \in$[0,4] egitura-unitateen irudikapen grafikoa.



Silize amorfoaren sintesi-prozesu bitartean soilik agertu ohi dira Q_0 eta Q_1 egitura-unitateak; bukaerako produktuan topatzen dira, ordea, Q_2, Q_3 eta Q_4 egitura-unitateak. Hiru horietatik, Q_2 da zailena esperimentalki detektatzeko, oso proportzio txikian agertu ohi da-eta. Silizearen sare amorfoan egitura bereizgarriak topatu daitezke, eraztunak edo kateak esaterako. Gainera, silizio atomoek oxigenoak ez diren beste lotura batzuk ere eratu ditzakete, hala nola Si-OH. Aipaturiko lotura guzti horiek silizearen irismen laburreko loturak dira, eta materialaren sare beirakararen topologia determinatzen dute; materialaren kristalizazioan, bioaktibitatean ,edota iraunkortasun kimikoan berebiziko garrantzia duena (Hill eta Brauer, 2011). Arrazoi horregatik, funtsezkoa da material beirakaren nanoegitura kontuan hartzen duen karakterizazio metodo zehatz eta kuantitatiboak aztertu eta garatzea.

2 Arloko egoera eta ikerketaren helburuak

Nanomaterial beirakarak karakterizatzeko teknika erabilienetako bat da espektroskopia infragorria (IR). SiO_2 nanopartikulen kasuan, horien IR espektroa aspalditik aztertu eta eztabaidatu da (Kamitsos et al., 1993). Material horren inguruan ikerketa espektroskopiko ugari argitaratu badira ere, oraindik eztabaida asko dago haren espektro infragorriaren zenbait bibrazio-moduren jatorriaren inguruan, batez ere 800 - 1300 cm^{-1} uhin-zenbaki tartean ageri diren xurgatze-bandei dagokionez (Innocenzi, 2003; Bertoluzza et al., 1982).

IR espektroskopia oso teknika zabaldua bada ere, ez ohi da material beirakaren egituraren inguruko informazio kuantitatiboa emateko erabiltzen (Fredholm et al., 2010); eta, normalean, beste helburu batzuekin gauzatzen dira nanopartikulen inguruko ikerketa espektroskopikoak, hala nola, horien gainazalean atxikirik egon daitezkeen espezie kimikoak identifikatzeko. Hala ere, jakina da IR espektroskopiak informazio garrantzitsua eman dezakeela beiren egitura-unitateen izaera eta loturen inguruan.

Lan honen helburua nanomaterial beirakaren egitura aztertzeko metodo bat aurkeztea da, espektroskopia infragorrian oinarritua eta informazio kuantitatiboa ematen duena. Erreflektantzia infragorriaren bidez, alde batetik, silizezko nanopartikulen funtzio dielektrikoa aterako da, eta bestetik, Q_3 eta Q_4 egitura-unitateen populazioa kalkulatuko da. Azken balio horiek erresonantzia magnetiko nuklearrak emandako datuekin parekatuko dira emaitzak balioztatzeko asmoz.

3 Ikerketaren muina

Atal honetan, alde batetik, erabilitako materiala, eginiko esperimentuak eta burututako kalkuluak azalduko dira, bestetik, lorturiko emaitzak aurkeztuko dira.

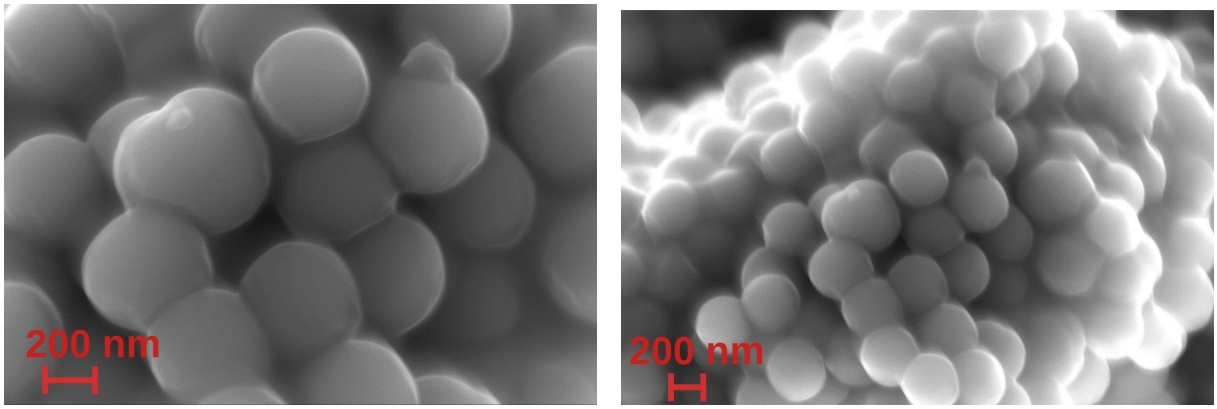
3.1 Materiala eta metodoak

3.1.1 Nanopartikulen sintesi eta karakterizazioa

Stöber sol-gel prozesuaren bidez sintetizatu dira ikergai ditugun silize nanopartikulak (Stöber et al., 1968), eta, mikroskopia elektronikoa erabiliz (*Scanning Electron Microscopy*, SEM), horien tamaina, morfologia eta sakabanaketa aztertu dira.

2. Irudian ikus daiteke partikulen tamaina-banaketa monosakabanatua dela; hots, ez dago alde nabaririk . Horretaz gain, Stöber sintesi prozesuaren bidez lortu ohi den forma esferiko definitua dute nanopartikulek, bestalde, azaleko irregulartasun esanguratsurik gabekoak dira eta aglomeratuak osatzen dituzte.

2. Irudia: Bi handipen ezberdinetan ateratako silize nanopartikulen SEM irudiak.



(a) (b)

3.1.2 Espektroskopia infragorria

Ondoren, sintesian lorturiko nanopartikulen hautsa pastilla-molde batean sartuz, eta prentsa hidrauliko baten bidez konprimituz, 13 mm-ko diametrodun pastilla zilindrikoa prestatu da. Pastillaren dentsitatea kalkulatu ahal izateko, hori pisatu eta mikroskopio optiko digital baten bidez bere dimentsioak neurtu ditugu.

Hurrengo urratsa pastillaren erreflektantzia (R) neurtzea izan da. Gorputz baten islapen ahalmena ezaugarritzen du erreflektantziak: gorputzaren gainazalera iristen den erradiazio elektromagnetikoaren eta islatzen denaren arteko zatiketa da, [0,1] tarte errealean definitzen dena. Menpekotasun ugari ditu propietate horrek, besteak beste, gorputzaren tenperaturaren eta erradiazio elektromagnetikoaren maiztasunaren araberakoa da.

Erreflektantzia neurketak egiteko, Hyperion 3000 mikroskopioa erabili dugu, 15x Cassegrain objetibo batez (0.4-ko apertura numerikoa) eta *wide-band* MCT detektagailu batez (Mercury Cadmium Telluride) horniturik dagoena. Nitrogeno likidoz hozturik, 500 - 7500 cm^{-1}-ko uhin-zenbaki tartean neurketak egiteko aukera ematen du mikroskopioak, eta urrezko ispilu bat du bere baitan integraturik neurketen erreferentzia gisa erabiltzeko. Uhin-zenbakia (k) uhin-luzera (λ) deritzogunaren alderantzizkoa da, azken hori uhinaren hedapen-abiadura eta maiztasunaren arteko zatidura izanik. λ eta k baliokideak badira ere, espektroskopian uhin-zenbakia da erabili ohi dena.

3.1.3 Egitura-unitateen populazioaren kalkulua

Jarraian, erreflektantzia espektrotik nanopartikulen funtzio dielektrikoa lortzea izan dugu helburu. Izaera konplexudun funtzio horrek materialaren informazio optiko zein estrukturala gordetzen du. Horretarako, kontuan hartu beharra dago aztertu dugun pastilla fabrikatzeko nanopartikulen hautsa konprimitu dugunean, pastillaren barnean aire-guneak sortu direla. Hau da, pastilla porotsua da eta izaera heterogeneoa du, bere funtzio dielektrikoan islatuko dena.

Pastillaren funtzio dielektrikoa nanopartikulen eta airearen funtzio dielektrikoarekin erlazionatzen ditu Landau-Lifshitz-Looyenga (LLL) formulak (Looyenga, 1965):

$$\varepsilon_{pastilla}^{1/3} = f\varepsilon_{NP}^{1/3} + (1-f)\varepsilon_{airea}^{1/3} \tag{1}$$

non $\varepsilon_{pastilla}$ pastillaren funtzio dielektrikoa, ε_{NP} nanopartikulen funtzio dielektrikoa, ε_{airea} = 1 airearen funtzio dielektrikoa eta f pastillaren dentsitate erlatiboa diren.

Pastillaren erreflektantzia bere funtzio dielektrikoarekin erlazionatzen da Fresnelen erlazioen bitartez, hortaz, LLL formulak aurresandako erreflektantzia datu esperimentalekin doitzea lortzen da $\varepsilon_{pastilla}$ aldagaia doituz. ε_m eta f aldagaiak ezagunak direnez, ε_{NP} aldatuz lortuko dugu $\varepsilon_{pastilla}$ doitzea. ε_{NP} Gauss-en funtzioak erabiliz eraiki dugu (De Sousa Meneses et al., 2006).

Silizearen erreflektantzia espektroan, bandak sortzen dituzte Q_3 eta Q_4 egitura-unitateek, hau da, bakoitzari doikuntzan erabilitako Gauss-en funtzio bat dagokio. Bi egitura-unitate horien populazioaren estimazio kuantitatiboa banden azaleratik abiatuta kalkulatu dezakegu honako ekuazio hauek aplikatuz (Santos et al., 2012; Naji et al., 2015):

$$n(\mathrm{Q_3}) \quad = \frac{A(\mathrm{Q_3})}{aC}, \tag{2}$$

$$n(\mathrm{Q_4}) \quad = \frac{A(\mathrm{Q_4})}{2(1-\delta)C} \tag{3}$$

non $A(\mathrm{Q_3})$ eta $A(\mathrm{Q_4})$ egiturei dagozkien banden azalera diren, a Q_3 eta Q_4 egituren arteko aktibitate infragorriaren zatiketa, δ desordena dinamikoan parte hartzen duen Q_4 egituren portzentaia den eta C normalizazio-konstantea den.

3.1.4 Erresonantzia magnetiko nuklearreko espektroskopia

Azkenik, erresonantzia magnetiko nuklear esperimentua burutu dugu (EMN), zeina izen bereko fenomeno fisikoan oinarrituta dagoen: eremu magnetiko indartsu eta konstantepean dagoen nukleo bat eremu magnetiko oszilakor ahul batez pertubatzen denean, nukleoak seinale elektromagnetikoa igorriko du, nukleoaren, ingurune kimikoaren eta eremu magnetikoaren araberakoa dena. Seinale horiek jasota aztergai den materiala osatzen duten nukleoen eta horien ingurumen kimikoaren inguruko informazioa jaso dezakegu. Kasu honetan, seinalea Gauss-en funtzio bidez doituta modu kantitatiboan kalkulatu dezakegu nanopartikuletan dagoen Q_4 eta Q_3 silize egituren populazioehunekoa, erreflektantzia bidez lorturiko datuekin parekatuko dena. Neurketak egiteko Bruker Avance III WB 300 MHz EMN instrumentua eta *Magic Angle Spinning* (MAS-EMN) teknika erabili ditugu, erantzun anisotropikoa minimizatzeko asmoz. Neurketak CEMHTI lagorategian egin dira eta tetrametil-silanoa erabili da erreferentziazko patroi moduan desplazamendu kimikoa kalibratu ahal izateko.

3.2 Emaitzak

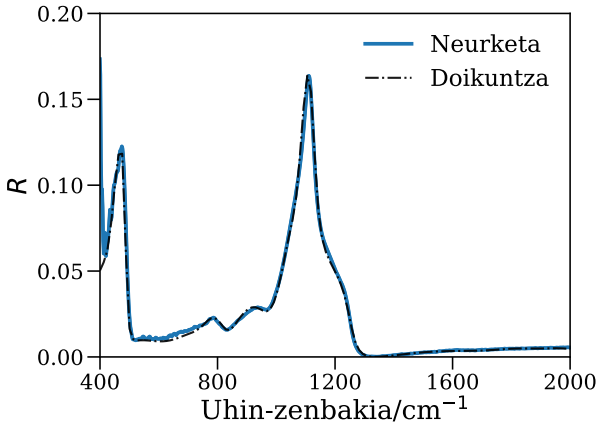
3. Irudian, urdinez irudikaturik ikus daiteke pastillaren erreflektantzia espektroa, eta marra etenez LLL formula erabiliz lorturiko kurba, datu esperimentalekin bat egiteko doitu dena.

4. Irudian ikus daiteke doikuntza hori egiteko eraiki den nanopartikulen funtzio dielektrikoa (ε_{NP}). (a) azpi-irudian nanopartikulen funtzio dielektrikoaren zati erreal zein irudikaria ageri dira. Zati irudikaria hobeto aztertzeko asmoz, (b) azpi-irudian irudikatu da horren handipena, hura osatzeko erabili ditugun Gauss-en funtzioekin batera (grisez). Ageri diren bandak silizeak espektro infragorrian erakutsi ohi dituenak dira (Innocenzi, 2003).Q_4 eta Q_3 tetraedroei dagozkien banden azalera (larajaz eta berdez koloreztaturik) 2 eta 3 ekuazioetan ordezkatuz estimatu dugu egitura-unitateen populazioa eta horren errorea:

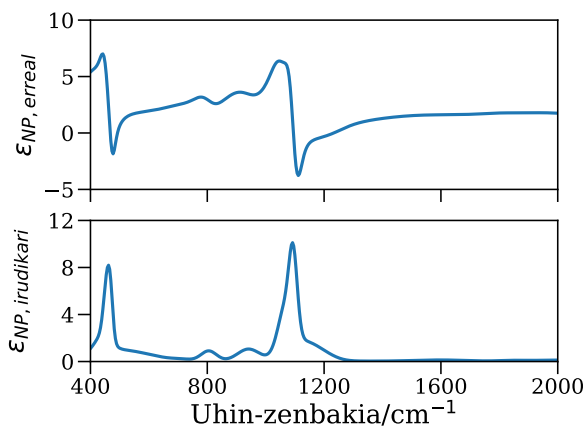
$n(\mathrm{Q_3})$ = %(32 $\pm$ 5)	$n(\mathrm{Q_4})$ =%(68 $\pm$ 5)

Kalkulu hori egiteko a = 1.3 eta δ = 0.18 erabili ditugu, beira makroskopikoen azterketan aplikatu ohi diren balioak (Santos et al., 2012; Naji et al., 2015). Goi-estimazioa egin da emaitzaren errorea determinatzeko aurretik egindako ikerketetan oinarrituz.

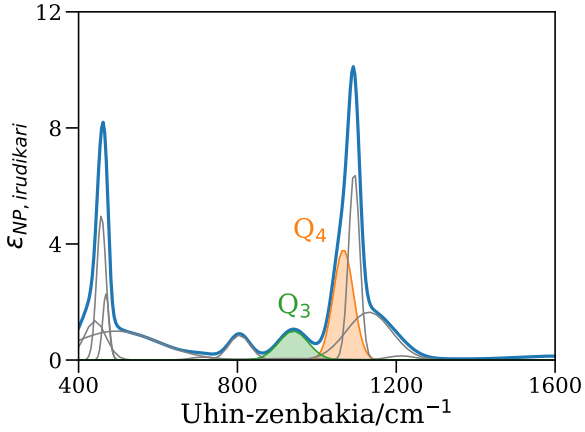
3. Irudia: Nanopartikula hautsarekin fabrikaturiko pastillaren erreflektantzia espektru esperimentala (urdinez), eta LLL formula aplikatuz (1 ekuazioa) eginiko doikuntza (marra etenez).



4. Irudia: (a) Nanopartikulen funtzio dielektrikoaren zati erreal (ε_{erreal}) eta irudikaria ($\varepsilon_{irudikari}$) ageri dira. (b) Funtzio dielektrikoaren zati irudikariaren handipena ageri da, hori osatzen duten Gauss-en funtzioak irudikatu dira.



(a)



(b)

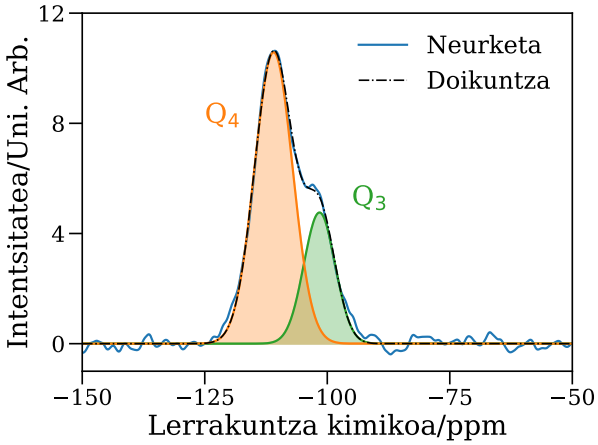
5. Irudian EMN esperimentuaren emaitzak ikus daitezke. Bi Gauss-en funtzio bidez doitu da kurba esperimentala, Q_3 eta Q_4 egiturei dagozkienak. Funtzio horien azalera erlatiboa kalkulatuz, egitura-unitateen populazioaren honako estimazio kuantitatiboa hau lortu dugu:

$$n_{EMN}(Q_3) = \%(28 \pm 1) \qquad n_{EMN}(Q_4) = \%(72 \pm 1)$$

Erroreei dagokienez, EMN metodoaren bitartez lorturikoa doikuntza-errorea baino ez da, esperimentu kuantitatiboa delako. Metodo infragorriarenak, ordea, bi iturri nagusi ditu: alde batetik, dekonboluzio-errorea, eta, bestetik, a zein δ parametroena. Azken teknika horren errorea modu kontserbatzailean estimatu dugu, aurreko artikulutan lortutakoan oinarrituz (Santos et al., 2012). Gai hori gehiago landuko dugu etorkizuneko artikulu batean.

Bi tekniken bidez lorturiko balioak bateragarriak dira, hortaz, frogatu dugu nanopartikulen Q_3 eta Q_4 egitura-unitateen populazioaren estimazio kuantitatiboa egin daitekeela.

5. Irudia: EMN esperimentuaren bidez lorturiko neurketa eta Gauss-en funtzio bidez eginiko doikuntza. Doikuntza egiteko erabilitako Gauss-en funtzioak berdez eta laranjez irudikatu dira, Q_3 eta Q_4 egiturei dagozkienak, hurrenez hurren.



4 Ondorioak

Espektroskopia infragorriaren bidez nanomaterial beirakara baten (sol-gel silize nanopartikulak) egituraren inguruko informazio kuantitatiboa lor daitekeela frogatzen du lan honek. Teknika horrek emandako datu esperimentak LLL formularen bidez doituz, nanopartikulen funtzio dielektriko atera dugu, silizearen ohiko absortzio-banden bitartez eraiki dena. Funtzio dielektrikotik kalkulatutako Q_3 eta Q_4 egitura-unitateen populazioak $\%(32 \pm 5)$ eta $\%(68 \pm 5)$ izan dira, hurrenez hurren. Emaitza horiek EMN esperimentuak emandakoekin bateragarriak dira ($\%(28 \pm 1)$ eta $\%(72 \pm 1)$), gure metodoaren baliozkotasuna bermatzen duena.

Erreflektantzia esperimentuak egiteko ekipamendua ikerketa-gune ugaritan topatu daiteke, teknika oso zabaldua dago eta EMN neurketak egiteko behar den tresneria baino sinpleagoa eta eskuragarriagoa da. Hortaz, nahiz erreflektantzia espektroskopiaren bidez lorturiko emaitzak EMN bidez lorturikoak bezain zehatzak ez izan (errorea handiagoa da), ikerlari askoren esku jartzen du nanomaterial beirakarren egitura-analisi kuantitatiboak egiteko aukera.

5 Etorkizunerako planteatzen den norabidea

Eraikitako analisi kuantitatiboaren ahalmena ezagutzeko eta bere erreproduzigarritasuna bermatzeko, metodoa beste lagin batzuekin frogatuko da. Hasieran, beste motatako silizezko NPak aztertuko ditugu, baina nanosilikato orokorrekin ere balioztatuko dugu metodoa.

Erreferentziak

Bertoluzza, A., Fagnano, C., Morelli, M. A., Gottardi, V., & Guglielmi, M. (1982). Raman and infrared spectra on silica gel evolving toward glass. *Journal of Non-Crystalline Solids*, 48(1):117–128.

De Sousa Meneses, D., Malki, M., & Echegut, P. (2006). Structure and lattice dynamics of binary lead silicate glasses investigated by infrared spectroscopy. *Journal of Non-Crystalline Solids*, 352(8):769–776.

Fredholm, Y. C., Karpukhina, N., Law, R. V., & Hill, R. G. (2010). Strontium containing bioactive glasses: glass structure and physical properties. *Journal of Non-Crystalline Solids*, 356(44-49):2546–2551.

Fu, H., Bai, Z., Li, P., Feng, X., Hu, X., Song, X., & Chen, L. (2022). Molecular imprinted electrochemical sensor for ovalbumin detection based on boronate affinity and signal amplification approach. *Food Chemistry*, 135292.

Hill, R. G. & Brauer, D. S. (2011). Predicting the bioactivity of glasses using the network connectivity or split network models. *Journal of Non-Crystalline Solids*, 357(24):3884–3887.

Innocenzi, P. (2003). Infrared spectroscopy of sol–gel derived silica-based films: a spectra-microstructure overview. *Journal of Non-Crystalline Solids*, 316(2-3):309–319.

Kamitsos, E., Patsis, A., & Kordas, G. (1993). Infrared-reflectance spectra of heat-treated sol-gel-derived silica. *Physical Review B*, 48(17):12499.

Looyenga, H. (1965). Dielectric constants of heterogeneous mixtures. *Physica*, 31(3):401–406.

Naji, M., De Sousa Meneses, D., Guimbretiere, G., & Vaills, Y. (2015). In situ high-temperature probing of the local order of a silicate glass and melt during structural relaxation. *The Journal of Physical Chemistry C*, 119(16):8838–8848.

Santos, C. D., De Sousa Meneses, D., Montouillout, V., & Echegut, P. (2012). Infrared emissivity spectroscopy of a soda-lime silicate glass up to the melt. *arXiv preprint arXiv:1201.5676*.

Singh, L., Agarwal, S., Bhattacharyya, S., Sharma, U., & Ahalawat, S. (2011). Preparation of silica nanoparticles and its beneficial role in cementitious materials. *Nanomaterials and Nanotechnology*, 1:9.

Singh, L. P., Bhattacharyya, S. K., Kumar, R., Mishra, G., Sharma, U., Singh, G., & Ahalawat, S. (2014). Sol-gel processing of silica nanoparticles and their applications. *Advances in Colloid and Interface Science*, 214:17–37.

Steinbach, J. C., Fait, F., Mayer, H. A., & Kandelbauer, A. (2022). Monodisperse porous silica/polymer nanocomposite microspheres with tunable silica loading, morphology and porosity. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(23):14977.

Stöber, W., Fink, A., & Bohn, E. (1968). Controlled growth of monodisperse silica spheres in the micron size range. *Journal of Colloid and Interface Science*, 26(1):62–69.

Varshney, S., Nigam, A., Pawar, S. J., & Mishra, N. (2022). An overview on biomedical applications of versatile silica nanoparticles, synthesized via several chemical and biological routes: A review. *Phosphorus, Sulfur, and Silicon and the Related Elements*, 197(2):72–88.

6 Eskerrak eta oharrak

Lan hau Mireia Sainz Menchónen MALean oinarrituta dago. Egileek Eusko Jaurlaritzari eskerrak ematen dizkiote ikerketa-proiektuen bidez (IT-1714-22, PIBA-2021-1-0022), eta doktorego aurreko eta ondorengo beken bidez (M. Sainz-Menchón: PRE-2022-1-0086, I. González de Arrieta: POS-2022-2-0027) lan hau finantziatu izanagatik. Mireia Sainz-Menchónek eskerrak eman dizkio CNRS Orléanseko CEMHTI laborategiari masterreko egonaldia egin ahal izanagatik. Azkenik, egileek Abdelali Zakiri eta Franck Fayoni eskerrak ematen dizkiete.

Kannabinoideak eta polimeroak: hamaika aukera kapsula terapeutikoen garapenean

Aitor Villate (1,2), Gaston Pablo Barreto (3), Markel San Nicolas (1,2,4), Maitane Olivares (1,2), Oier Aizpurua-Olaizola (4) eta Aresatz Usobiaga (1,2)

(1) Kimika Analitikoa Saila, Zientzia eta Teknologia Fakultatea (ZTF), Euskal Herriko Unibertsitatea, 48940, Leioa, Euskal Herria

(2) Plentziako Itsas Estazioa (PIE), Euskal Herriko Unibertsitatea (EHU), 48620, Plentzia, Euskal Herria

(3) Centro de Investigaciones en Física e Ingeniería del Centro de la Provincia de Buenos Aires (CIFICEN), 7000, Olavarría-Tandil, Buenos Aires, Argentina;

(4) Sovereign Fields S.L., 20006, Donostia, Euskal Herria

aitor.villate@ehu.eus

Laburpena

Kannabis landarean aurkitzen diren kannabinoideen ahalmena medikuntzaren esparruan ezaguna da. Δ^9-tetrahidrokannabinola (THC) eta kannabidiola (CBD), kannabinoide ezagunenak eta erabilienak badira ere, landarean kantitate txikiagotan aurkitzen diren kannabinoideak mantentzen dituzten eta aho-bidetik har daitezkeen produktuen eskaera dago azken aldian. Kannabinoideen aho bidezko kontsumo eraginkorra ahalbidetzen duten matrize polimerikoen erabilera aztertzeko, bi "full-spectrum" kapsula desberdin sintetizatu dira eta hauen erkaketa burutu da lan honetan. Eratutako kapsulak ezaugarri eta aplikazio-eremu desberdinak dituztenez, kannabis terapeutikoren aniztasuna modu praktiko batean aurkezteko aukera eman digute.

Hitz gakoak: kannabis medizinala, kannabinoideak, PLGA, alginatoa,

Abstract

The cannabinoids that are found in the plant species Cannabis have a well-known potential in the field of medicine. Although Δ^9-tetrahydrocannabinol (THC) and cannabidiol (CBD) are the most notorious and used cannabinoids, a growing demand on edible products that maintain the minor cannabinoids present in the plant has emerged recently. In order to study the use of polymeric matrixes employed to provide an efficient oral administration of cannabinoids, two full-spectrum capsules have been synthetized and compared in the present work. Since the created capsules have different properties and application fields, they have brought us the opportunity to present the versatility of therapeutic cannabis with a practical approach.

Keywords: medicinal cannabis, cannabinoids, PLGA, alginate

1. Sarrera eta motibazioa

Urte askotan zehar eszeptizismoaren itzalean egon ostean, badirudi kannabis terapeutikoa argia ikusten hasi dela azken urteetan. Mundu mailan 64 herrialdeek baimentzen dute kannabisaren erabilera helburu terapeutikoetarako, eta bere ekoizpena eta erabilera esponentzialki igo dira azken hamar urteetan **(UNODC, 2022)**. Mediku gehienek eraginkortzat jotzen dute zenbait gaixotasun terminalen sintomak, mina eta espastizitatea arintzeko **(Hordowicz et al., 2021)**. Gaixo askok min kronikoari eta zenbait gaixotasun mentalei aurre egiteko nahiago dute kannabisean oinarritutako produktuak hartzea, ohikoak diren farmakoen (opioideak, antsiolitikoak, depresioaren kontrako farmakoak, eta abar) ordezko gisa **(Charoenporn et al., 2022)**.

Kannabisaren propietate terapeutikoen erantzulea, landarean ekoizten diren kannabinoideen eta gizakion gorputzean aurkitzen diren errezeptore endokannabinoideen arteko elkarrekintza da. Kannabinoideak landare emeen loreetan sintetizatzen dira lorakuntza-garaian, gainerako kannabinoideen aitzindaria den azido kannabigerolikotik (CBGAtik) abiatuta **(Brenneisen, 2007)**. Konposatu hauek, sistema endokannabinoidea osatzen duten CB_1 eta CB_2 errezeptoreekiko afinitate handia daukate. Horregatik, errezeptore hauetara heltzean, sistema honek erregulatzen dituen funtzioetan eragiten du, hala nola, gosean, memorian, garapen neurologikoan, minaren sentsazioan, estresean, hanturan, ugalkortasunean eta beste hainbat prozesu biologiko zein psikologikoetan ere. Kannabinoide bakoitzak afinitate desberdina dauka errezeptore hauekiko,

eta horren ondorioz kannabinoide bakoitzak efektu desberdinak eragingo ditu sistema endokannabinoideak erregulatzen dituen funtzioetan **(Wallach, 2021)**.

Kannabionide guztien artean Δ^9-tetrahydrokannabinola (THC) eta kannabidiola (CBD) dira ospetsuenak, landarean ekoizten diren bi kannabinoide nagusiak baitira kannabis barietate gehienetan, eta biek propietate terapeutiko sendoak aurkezten dituzte. THCa, kannabisari egozten zaion efektu psikotropikoen erantzulea da, eta propietate analgesikoak, antiinflamatorioak eta antiemetikoak dauzka. CBDak bestalde, ez du efektu psikotropikorik eragiten, eta propietate antipsikotikoak, antsiolitikoak, analgesikoak, antiinflamatorioak eta antikobultsiboak ditu. Bi kannabinoide hauekin batera, landarean kantitate baxuagoan dauden beste hainbat kannabinoide ezagutzen dira (egun 120 baino gehiago identifikatu dira), ospetsuenak kannabinola (CBN), kannabigerola (CBG) eta kannabikromenoa (CBC) izanik. Kannabisean, konposatu hauez gain, landarearen usainaren erantzule diren terpenoak ere aurki daitezke. Konposatu guzti horiek propietate terapeutiko desberdinak erakutsi badituzte ere, kantitate txikietan aurkitzen dira normalean, eta beraien interes handiena THCaren eta CBDaren ezaugarrien sinergitzaileak izatea da **(Stella et al., 2021)**.

Konposatu hauek bide desberdinetatik har daitezke; inhalazioz, ahotik, zain barnetik, azaletik zein ondestetik har daitezke, esaterako. Hauen artean, lorea erretzea bide ohikoena bada ere erabiltzaile ludikoen artean, gaixoentzat gomendagarriena aho-bidea da. Izan ere, bide honek denbora luzeko efektuak eragiten ditu, errazena da hartzeko, eta, toxizitate baxua eragiten du erretzearekin alderatuta esaterako. Beste bideekin konparatuta aho-bideak bi desabantaila nagusi izan ditzake, batetik, absortzioa motela eta errepikakortasun baxua izatea eta, bestetik, bioerabilgarritasuna baxua izatea **(Wallach, 2021)**. Desabantaila hauei aurre egiteko aukeretako bat kannabinoideak propietate jakineko "ibilgailu" polimerikoetan edo kapsuletan sartzea da, eta modu honetan, gaixoentzat seguruak, erosoak eta eraginkorrak diren farmako zein elikagaiak eratzen dira **(Light eta Karboune, 2022; Stella et al., 2021)**.

2. Arloko egoera eta ikerketaren helburuak

Aho-bidearen egokitasuna ezaguna denez gero, kannabinoideak dituzten ahoratzeko farmakoak eskuragai daude merkatuan, hala nola, Marinol® kapsula ezagunak (THC sintetikoarekin kargatuta) eta Cesamet™ (THCaren analogoa den kannabinoide sintetiko batekin kargatuta). Hauekin batera garapen fase aurreratuetan dauden formulazio anitz aurkitu daitezke; baina gehienek badute berezitasun bat: THCan soilik, CBDan soilik, edo, THCan eta CBDan soilik oinarritutako formulazioak dira, askotan jatorri sintetikoko kannabinoideak izanik **(Stella et al., 2021)**. Formulazio hauek, eraginkorrak badira ere, kannabinoide askoren abantail posibleak atzean uzten dituzte, eta zenbait aplikazioetarako landarearen kannabinoideen profil espektro osoa mantentzen dituzten produktuak are eraginkorragoak izan daitezke.

Formulazio mota hauek "full-spectrum" bezala ezagutzen dira, eta azken boladan hauekiko interesa handitu da. Kannabinoide desberdinak eta landarearen bestelako osagaiak batera egoterakoan, haien efektuen batura sinergikoa ematen da, "entourage" efektua deritzona. Efektu honi esker, kannabisaren propietate analgesikoen eta antiinflamatorioen hobekuntza ikusi izan da, baita kannabisaren albo-ondorioetako batzuen murrizketa ere, kannabinoide bakarra duten formulazioekin erkatuta. THC puruak, esaterako, gertakari psikotiko puntualak eragin ditzake; baina gainerako kannabinoideekin hartzerakoan (batez ere, CBDarekin), hauek emateko arriskua murriztu egiten da **(Maayah et al., 2020)**.

Aurrekoa kontuan hartuta, lan honetan jatorri desberdineko bi "full-spectrum" kannabis erauzkinetatik abiatuta bi kapsula mota desberdin egitea proposatu dugu, landare honek, materialen zientziek eta bien arteko konbinaketak duten indarra, moldakortasuna eta aplikagarritasuna modu praktiko batean aztertzeko asmoz. Helburu hauetarako, bi sintesiak aurrera eraman izan ditugu, eta eratutako produktuen erkaketa egin dugu haien karakterizazioen emaitzetatik.

3. Ikerketaren muina

3.1. "Full-spectrum" kannabis-erauzkinak

Kapsulak egin aurretik eta kannabinoide nagusien mailak ezagutzeko, jaso genituen kannabis-erauzkinak aztertu genituen bereizmen handiko likido-kromatografia eta lerrokatutako diodoen detektagailua (HPLC-DAD) erabiliz. Analisi hauen emaitzak 1. Taulan jasota daude, eta hauetatik zenbait ondorio atera daitezke erauzkinen jatorriaren eta tratamenduaren gainean.

Hasteko, erauzkinen purutasunari dagokionez, A erauzkinean kannabinoideen kantitatea askoz handiagoa dela ikus daiteke, masaren % 75a baino gehiago suposatzen dute, B erauzkinean % 15a gainditzen ez duten bitartean. THC eta CBD mailei erreparatuta jatorrizko landareak mota desberdinetakoak direla ondoriozta daiteke, A erauzkina "Kimiotipo II" landare batetik dator, THCa eta CBDa maila orekatua duelako, B erauzkina berriz "Kimiotipo I" landare batetik dator, THC kantitatea CBDarena baino askoz handiagoa delako. Bukatzeko, CBNa, THCaren degradazio-produktu bat izanda, askotan kannabis produktuen heldutasun-maila jakiteko erabiltzen da. Kasu honetan, B erauzkinak CBN kantitate altua duenez (THCaren parekoa) erauzkin zaharra dela esan daiteke. A erauzkinean berriz CBN kantitatea txikia denez, freskoa dela ondoriozta daiteke.

1. Taula. Erabilitako erauzien 5 kannabinoide nagusien edukia masa-ehunekotan adierazita.

Erauzkina	% THC	% CBD	% CBN	% CBG	% CBC
A	31	38	0,45	2,8	3,2
B	7,0	0,45	5,1	0,46	0,46

3.2. Kapsulen sintesia

Kannabis-erauzkinen desberdintasunak ikusita, formulazio desberdin bat proposatu dugu bakoitzarentzat. Alde batetik, A erauzkina PLGA polimero sintetikoarekin enkapsulatzea proposatu dugu, askapen moteleko farmakoak garatzeko oso erabilia izan dena. PLGArekin bide desberdinetatik (ahotik, zainetatik, azaletik…) har daitezkeen tamaina nanometrikoko kapsulak eratzeko aukera ematen dute. Hauek, behin gorputzean egonda enkapsulatuta dituen konposatuak hainbat ordutan zein egunetan zehar astiro-astiro askatzeko ahalmena dute **(Pardeshi et al., 2023)**. B erauzkina, bestalde, algetan jatorria duen alginato polimeroarekin enkapsulatzea aukeratu dugu. Alginatoa elikadura-osagai eta farmako anitz enkapsulatzeko erabili izan da, eta kapsula hauek heste meharrean askatzeko ahalmena dute. Aukera seguru eta merkea da, eta erraztasunez eskala handian ekoizteko aukera ematen du **(Ching et al., 2017)**.

PLGA kapsulak egiteko, nanoemultsioan oinarritutako metodo bat jarraitu dugu, CBD purua enkapsulatzeko erabilia izan dena **(Fraguas-Sánchez et al., 2020)**. Alginato kapsulak egiteko aldiz, Buchi B-390 enkapsulatzailea erabili dugu, US8808734B2 patentearen gomendioak eta gure ikerketa-taldean polifenolak enkapsulatzeko erabili zen metodoa jarraituz **(Aizpurua-Olaizola et al., 2016)**. Bi kasuetan, kapsulak lehortu aurretik chitosan izeneko polimeroarekin nahastu dugu, honekin kanpo geruza gehigarri bat eratzeko. Honi esker, kapsulen porotasuna txikitzea lortzen da, eta ondorioz, haien egonkortasuna bermatzea lortzen da. Pausu honen ostean, kapsulak lehortu egin dira liofilizadorearen laguntzaz.

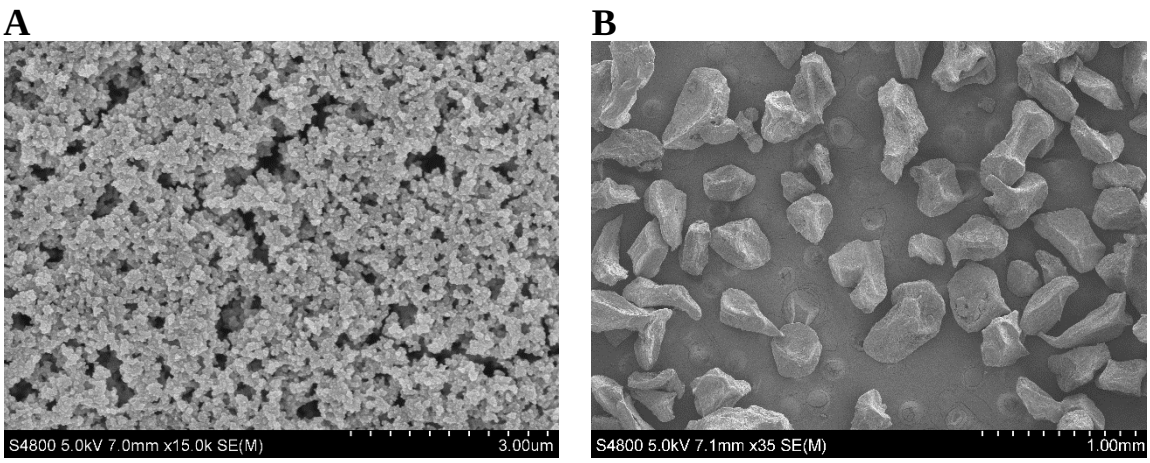
3.3. Kapsulen karakterizazioa

Eratutako bi kapsulen erkaketa aurrera eraman ahal izateko, hauen analisi fisiko-kimikoak burutu ditugu teknika desberdinen bitartez. Aztertu diren propietate fisikoak, kapsulen tamaina, forma, eta zeta-potentziala izan dira; eta horretarako ekorketa elektronikoko mikroskopioa (SEM) eta zeta-sizer izeneko gailua erabili dira. Analisi kimikoari dagokionez, kannabinoide nagusien analisia aurrera eraman dugu, beste lan batzuetan erabili diren tratamenduak jarraituta PLGA-A kapsuletarako **(Martín-Banderas et al., 2012)** eta alginato-B kapsuletarako **(Aizpurua-Olaizola et al., 2016)**, ondoren, HPLC-DAD bidezko kuantifikazioa eginda. Bukatzeko, irentsiz gero, giza gorputzean izango zuketen portaera aztertzeko, gure digestioaren *in vitro* simulazio estandarizatu bat aurrera eraman dugu **(Brodkorb et al., 2019)**. Horretarako, kapsulak urdaileko baldintza biokimikoak simulatzen dituen disoluzio batean murgildu ditugu 2 orduz (37 ºC, 150 rpm) eta jarraian, ingurune simulatua heste meharreko baldintzetara egokitu ostean, beste 4 orduz (37 ºC, 150 rpm) mantendu dira kapsulak, digestioa bukatu arte.

Simulazioan zehar jariakin simulatuen alikuotak hartu eta HPLC-DAD bidez analizatu dira, digestioaren une bakoitzean askatutako kannabinoide kantitatea ezagutzeko.

Ezaugarri fisikoei dagokionez, polimero bakoitzaren ezaugarriak eta erabilitako sintesi metodoak kontuan hartuta, espero zitezkeen desberdintasunak behatu ditugu. SEM irudiei erreparatuz (1. Irudia), tamaina eta forma desberdinekoak direla argi ikusi daiteke. PLGA-A kapsulen batez besteko tamaina 115 nm-koa da eta itxura esferikoa dute oro har, alginato-B kapsulek 460 µm-ko batez besteko tamaina eta itxura irregularra duten bitartean. Kapsulek morfologia esferikoa izatea bilatzen da normalean, forma irregularra duten kapsulek egonkortasun txikiagoa izan ditzaketelako, eta behin irentsita konposatu aktiboen askapena errepikakortasun txikiagokoa izan daitekeelako **(Lee et al., 2013)**. Tamainari dagokionez, aplikazio mediko gehienentzat 1000 µm-tik behetik egotea bilatzen da, eta ikus daitekeenez kapsula biek betetzen dute baldintza hau. Bukatzeko, bi kapsulen zeta-potentziala antzekoa izan da, PLGA-A eta alginato-B kapsuletan 19,8 mV-koa eta 14,6 mV-koa izanik, hurrenez hurren. Kanpo geruza egiteko erabilitako chitosan polimeroa karga positiboduna (kationikoa) da, eta PLGA zein alginatoa karga negatibodunak (anionikoak). Hortaz, bi kapsulen zeta-potentziala positiboa izateak kanpo geruza ondo eratu dela adierazten du. Hala ere, esan beharra dago, normalean zeta-potentziala 30 mV baino handiagoa izatea bilatzen dela, uretan dispertsioan dauden partikulen arteko atxikimenduak eta aglomerazioak ekiditeko balio minimotzat jotzen da-eta **(Gibson et al., 2009)**.

1. Irudia. (A) PLGA-A kapsulen eta (B) alginato-B kapsulen SEM irudiak.



Kapsulen kannabinoideen edukiari dagokionez (2. Taula), erauzkinetan gertatzen zen bezala, PLGA-A kapsuletan kannabinoideen edukia askoz altuagoa da alginato-B kapsuletan baino. Era berean, kannabinoideen profila desberdina da ere, PLGA-A kapsuletan THCa eta CBDa dira kannabinoide nagusiak dira alginato-B kapsuletan THCa eta CBNa diren bitartean. CBGa eta CBCa kasu bietan kannabinoide nagusiak baino 20 aldiz kontzentrazio txikiagoan daude. Hurrengo atalean azalduko denez, profil desberdintasunak haien aplikagarritasun eremua definituko du.

2. Taula. 5 kannabinoide nagusien edukia kapsula lehorretan, mg/g-tan adierazita.

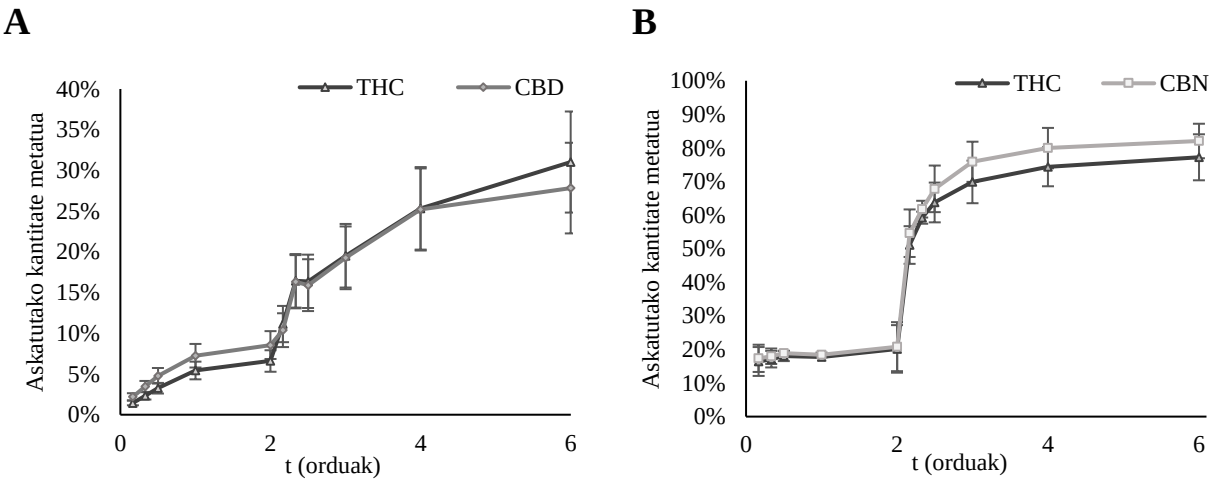
Kapsula	THC (mg/g)	CBD (mg/g)	CBN (mg/g)	CBG (mg/g)	CBC (mg/g)
PLGA-A	85	82	–	4,3	5,6
Alginato-B	4,0	0,22	2,7	0,28	0,26

Bukatzeko, digestioen simulazioetan desberdintasun nabariak ikusi dira bi kapsulen artean (2. Irudia). Berriz ere, ikusi diren desberdintasunak bat datoz polimero bakoitzaren ezaugarriekin (3.2. atalean aurkeztutakoak). Kasu bietan, kannabinoideen galera urdaileko digestioan (hasierako 2 orduak) txikia da, PLGA-A kapsuletan kannabinoideen % 10a baino gutxiago eta alginato-B kapsuletan % 20 inguruan askatzen direlarik. Behin heste meharreko fasea hasita (2. ordutik aurrera), PLGA-A kapsuletan, THCa eta CBDa erritmo motelean eta konstantean askatzen dira, eta fase hau bukatzerakoan (digestioaren 6. ordua) % 28 - 30 bitartean baino ez da askatzen. Honen ondorioz heste meharrean geratzen den frakzio bioeskuragarria % 20a ingurukoa da. Honek ordea, ez du esan nahi bioeskuragarritasun osoa hain baxua denik. Izan ere, PLGA-A kapsulen tamaina eta zeta-potentzial positiboa kontuan hartua, kapsulak heste meharreko mintzak zeharkatzeko eta odol korrontera pasatzeko gai izan daitezke. Behin odolean,

kannabinoideak gutxinaka askatzen jarraitu daitezke, hainbat ordutan zein egunetan ere, horrek dakarren kannabinoideen efektuak eragiteko ahalmenarekin **(Berrocoso et al., 2017)**.

Alginato-B kapsuletan aldiz, berehalako askapena ematen da heste meharreko baldintzetan, THCaren eta CBNaren edukiaren gehiengoa lehenengo 30 minutuetan askatzen da, eta digestioaren bukaera heldu orduko % 77 - 82 askatuta geratzen da. Honi esker, frakzio bioeskuragarria, hau da, heste meharreko mintzetatik xurgatzeko eskuragarri geratzen dena, hasierako edukiaren % 60a ingurukoa da.

2. Irudia. Kannabinoide nagusien askatutako kantitate metatua digestioan zehar, ahoratutako kantitate totalaren %-tan adierazita (A) PLGA-A eta (B) alginato-B kapsuletan.



3.4. Kapsulen erkaketa eta aplikagarritasuna

Kapsula bien konparaketa errazago egiteko, eta honi esker haien aplikagarritasunari buruz eztabaidatzeko, propietate adierazgarrienak 3. Taulan bildu dira, aurreko emaitzak kontuan hartuta, kapsula bakoitzaren ekoizpen-kostu estimatuarekin batera (laborategi eskalan estimatua). Kapsulen arteko erkaketa honetan, THCaren erreferentziazko dosiak kontutan hartuta (minimoa 2,5 mg-tan ezartzen dena eta maximoa 100 mg-tan balio ohikoenak 15-50 mg direlarik), kapsula hauek izango luketen kannabinoideen kargaren egokitasuna ere kalkulatu da **(Marangoni eta Marangoni, 2019)**. Ikus daitekeenez, eratutako bi kapsulak oso ezaugarri desberdinak dituzte, eta ondorioz bakoitzak aplikazio-eremu desberdina izango luke.

3. Taula. PLGA-A eta alginato-B kapsulen erkaketa finala.

	PLGA-A kapsulak	**Alginato-B kapsulak**
Tamaina	Nanometrikoa	Mikrometrikoa
Itxura	Esferikoa	Irregularra
Kannabinoideen kantitate totala	180 mg/g (altua)	7,5 mg/g (baxua)
Kannabinoide nagusiak	THC eta CBD	THC eta CBN
Askapena	Motela	Berehalakoa
Kostua	50 - 100 € /g	95 - 126 €/kg

PLGA-A kapsulek puntako ezaugarri fisiko-kimikoak dituzte, ekoizpen kostu altuen ordainetan. Ezaugarri hauei esker kapsulen kantitate txikiekin, THC eta CBD dosi altuak har daitezke, eta askapena motela izanik (digestioaz haratago doana) hainbat ordu zein egunetan zehar antzeman daitezkeen efektuak eragiteko aukera ematen dute. Ezaugarri hauek izanda, fibromialgiak, minbizi batzuk eta beste gaixotasun kroniko batzuk eragiten duten minari edo esklerosi anizkoitzak eragiten duen espastizitateari aurre egiteko eraginkorrak izan daitezke **(Stella et al., 2021)**. Ezaguna da THCaren eta CBDaren konbinazioak sintoma hauek modu eraginkorrean baretzeko ahalmena duela, eta kapsulen askapen motela bide, egokiak izan daitezke modu jarraituan hartzeko.

Alginato-B kapsulen propietateak, bestalde, hain apartekoak ez badira ere, nahikoak dira zenbait aplikazioetarako, eta, abantaila gisa, hauen produkzio-kostua askoz baxuagoa dela azpimarratu daiteke.

Alginato-B kapsulekin THCaren eta CBNaren dosi txikiak har daitezke, 1-2 ordutan nabarmentzen hasi daitezkeenak eta ordu gutxitan desagertzen direnak. CBNak THCaren antzeko efektuak sortzen ditu, efektu psikotropikorik eragin gabe, beraz kapsula hauek THC dosi puntual txikien aplikazio-eremuan sartu daitezke. Hala nola, min puntual txikiei, estresari eta kimioterapiaren goragaleei aurre egiteko erabilgarriak izan daitezke, baita jangura estimulatze edota lasaigarri moduan hartzeko ere **(Stella et al., 2021; Wallach, 2021)**.

4. Ondorioak

Lan honen helburua kannabis terapeutikoaren eta aho bideko formulazioen nondik norakoak modu praktiko batean aztertzea izan da, bi formulazio desberdinen sintesia aurrera eramanda eta hauen zenbait propietateen azterketa eginda. Azterketa honi esker argi geratu da alde batetik, kannabisaren erabilera mota askotarikoa izan daitekeela; kannabinoide-profil desberdinak daude eta bakoitzak bere esparrua dauka, hemendik datorrelarik, hein handi batean, landare honen nazioarteko ospea osasunaren esparruan. Beste alde batetik, guztiz desberdinak diren bi polimero erabiltzerakoan, materialen zientziak daukan indarra ere agerian geratu da. Tamaina, forma eta printzipio aktiboen askapen ezaugarri desberdinak dituzten bi formulazio lortu dira, eta bakoitzak bere aplikazio-eremua ere izan dezakeela ikusi da. Honekin guztiarekin, oraindik hedatzeke dagoen "full-spectrum" kannabis formulazioen esparruan, etorkizunean baliozkoak izan daitezkeen bi aukera berri aurkeztu dira.

5. Etorkizunerako lan-ildoak

Lortutako emaitzak esperantzagarriak badira ere, osasun-produktuen garapena oso gai zaila eta delikatua da, eta formulazio mota hauekin bide horretan aurreratzeko erronka asko gainditu beharra dago, asko gure ezagutza esparrutik haratago geratzen direnak. Hauen artean interes handikoa izan daitekeen erronketako bat, kapsulen farmako-zinetiken azterketa izango litzateke, digestio-sistema emulatzen duten sistema konplexuagoekin edota saguekin frogak eginda.

Honekin batera, propietate desberdineko beste formulazio batzuen garapena aurrera eramatea esku artean daukagu. Honen harira esaterako, PLGArekin CBDan aberatsak edo CBGan aberatsak diren landare kimiotipoekin lan egitea planteatu dugu.

6. Erreferentziak

Aizpurua-Olaizola, O., Navarro, P., Vallejo, A., Olivares, M., Etxebarria, N., eta Usobiaga, A. (2016). Microencapsulation and storage stability of polyphenols from Vitis vinifera grape wastes. *Food Chemistry*, *190*, 614–621. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.05.117

Berrocoso, E., Rey-Brea, R., Fernández-Arévalo, M., Micó, J. A., eta Martín-Banderas, L. (2017). Single oral dose of cannabinoid derivate loaded PLGA nanocarriers relieves neuropathic pain for eleven days. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, *13*(8), 2623–2632. https://doi.org/10.1016/j.nano.2017.07.010

Brenneisen, R. (2007). Chemistry and Analysis of Phytocannabinoids and Other Cannabis Constituents. In M. A. ElSohly (Ed.), *Marijuana and the Cannabinoids* (pp. 17–49). Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-59259-947-9_2

Brodkorb, A., Egger, L., Alminger, M., Alvito, P., Assunção, R., Ballance, S., Bohn, T., Bourlieu-Lacanal, C., Boutrou, R., Carrière, F., Clemente, A., Corredig, M., Dupont, D., Dufour, C., Edwards, C., Golding, M., Karakaya, S., Kirkhus, B., Le Feunteun, S., … Recio, I. (2019). INFOGEST static in vitro simulation of gastrointestinal food digestion. *Nature Protocols*, *14*(4), Article 4. https://doi.org/10.1038/s41596-018-0119-1

Charoenporn, V., Charernboon, T., eta Mackie, C. J. (2022). Medical Cannabis as a Substitute for Prescription Agents: A Systematic Review and Meta-analysis. *Journal of Substance Use*, *0*(0), 1–13. https://doi.org/10.1080/14659891.2022.2070870

Ching, S. H., Bansal, N., eta Bhandari, B. (2017). Alginate gel particles–A review of production techniques and physical properties. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *57*(6), 1133–1152. https://doi.org/10.1080/10408398.2014.965773

Fraguas-Sánchez, A. I., Torres-Suárez, A. I., Cohen, M., Delie, F., Bastida-Ruiz, D., Yart, L., Martin-Sabroso, C., eta Fernández-Carballido, A. (2020). PLGA Nanoparticles for the Intraperitoneal Administration of CBD in the Treatment of Ovarian Cancer: In Vitro and In Ovo Assessment. *Pharmaceutics*, *12*(5), 439. https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12050439

Gibson, N., Shenderova, O., Luo, T. J. M., Moseenkov, S., Bondar, V., Puzyr, A., Purtov, K., Fitzgerald, Z., eta Brenner, D. W. (2009). Colloidal stability of modified nanodiamond particles. *Diamond and Related Materials*, *18*(4), 620–626. https://doi.org/10.1016/j.diamond.2008.10.049

Hordowicz, M., Klimkiewicz, A., Jarosz, J., Wysocka, M., eta Jastrzębska, M. (2021). Knowledge, attitudes, and prescribing patterns of cannabis and cannabinoid-containing medicines among European healthcare workers: A systematic literature review. *Drug and Alcohol Dependence*, *221*, 108652. https://doi.org/10.1016/j.drugalcdep.2021.108652

Lee, B.-B., Ravindra, P., eta Chan, E.-S. (2013). Size and Shape of Calcium Alginate Beads Produced by Extrusion Dripping. *Chemical Engineering eta Technology*, *36*(10), 1627–1642. https://doi.org/10.1002/ceat.201300230

Light, K., eta Karboune, S. (2022). Emulsion, hydrogel and emulgel systems and novel applications in cannabinoid delivery: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *62*(29), 8199–8229. https://doi.org/10.1080/10408398.2021.1926903

Maayah, Z. H., Takahara, S., Ferdaoussi, M., eta Dyck, J. R. B. (2020). The molecular mechanisms that underpin the biological benefits of full-spectrum cannabis extract in the treatment of neuropathic pain and inflammation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, *1866*(7), 165771. https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2020.165771

Marangoni, I. P., eta Marangoni, A. G. (2019). Cannabis edibles: Dosing, encapsulation, and stability considerations. *Current Opinion in Food Science*, *28*, 1–6. https://doi.org/10.1016/j.cofs.2019.01.005

Martín-Banderas, L., Álvarez-Fuentes, J., Durán-Lobato, M., Prados, J., Melguizo, C., Fernández-Arévalo, M., eta Holgado, M. Á. (2012). Cannabinoid derivate-loaded PLGA nanocarriers for oral administration: Formulation, characterization, and cytotoxicity studies. *International Journal of Nanomedicine*, *7*, 5793–5806. https://doi.org/10.2147/IJN.S34633

Pardeshi, S. R., Nikam, A., Chandak, P., Mandale, V., Naik, J. B., eta Giram, P. S. (2023). Recent advances in PLGA based nanocarriers for drug delivery system: A state of the art review. *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*, *72*(1), 49–78. https://doi.org/10.1080/00914037.2021.1985495

Stella, B., Baratta, F., Della Pepa, C., Arpicco, S., Gastaldi, D., eta Dosio, F. (2021). Cannabinoid Formulations and Delivery Systems: Current and Future Options to Treat Pain. *Drugs*, *81*(13), 1513–1557. https://doi.org/10.1007/s40265-021-01579-x

UNODC. (2022). *World Drug Report 2022*. United Nations : Office on Drugs and Crime. //www.unodc.org/unodc/en/data-and-analysis/world-drug-report-2022.html

Wallach, J. (2021). Chapter 5 - Medicinal Cannabis: An overview for health-care providers. In A. Adejare (Ed.), *Remington (Twenty-third Edition)* (pp. 75–101). Academic Press. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-820007-0.00005-2

7. Eskerrak eta oharrak

Lan hau Eusko Jaurlaritzako Hezkuntza Sailaren finantzazioari esker eraman da aurrera, IT-1446-22 ikerketa talde kontsolidatuari esker, hain zuzen. Halaber, A. Villate ikertzaileak eskerrak eman nahi dizkio Euskal Herriko Unibertsitateari bere doktoretza aurreko laguntzagatik eta baita Sovereing Fields enpresari eskainitako euskarriagatik.

Antibiotikoen kutsadura ingurunean: transferentzia elikadura-katean zehar

Irantzu Vergara-Luis[1,2], Juan Carlos Báez-Millán[1], Olatz Zuloaga[1,2], Maitane Olivares[1,2], Ailette Prieto[1,2]

[1]Kimika Analitikoa Saila, Zientzia eta Teknologia Fakultatea, Euskal Herriko Unibertsitatea (UPV/EHU), Leioa, Euskal Herria

[2]Plentziako Itsas Estazioa (PiE), Euskal Herriko Unibertsitatea (UPV/EHU), Plentzia, Euskal Herria

irantzu.vergara@ehu.eus

Laburpena

Azken urteotan, antibiotikoen kutsadura ingurunean areagotu da eta, honen ondorioz, eratorritako arazoak ere bai, bakterio erresistenteen agerpena esaterako. Antibiotikoen eta beraien degradazio produktuen presentzia monitorizatzeko beharrak, konposatu horiek guztiak ingurumeneko matrize desberdinetan (uretan, lurzoruetan eta abar) kuantifikatzeko metodoak garatu behar dira, erresistentziak non eta nola sortzen diren argitzeko, besteak beste. Lan honetan hogeita-lau antibiotiko, hiru fungizida eta hauen degradazio-produktuak aldi berean analizatzeko metodo analitikoak optimizatu eta balioztatu dira barazkietan, lurzoru:konpost nahasteetan, simaurrean eta *Eisenia foetida* zizareetan. Metodoen sentikortasunak lagin errealetan kontzentrazio baxuan egon daitezkeen antibiotikoen kuantifikazioa bermatu du, eta antibiotikoak elikadura-katean metatzen diren ere aztertzeko aukera eman du.

Hitz gakoak: Antibiotikoak, transformazio produktuak, kutsadura, ingurumena, likido-kromatografia, masa-espektrometria

Abstract

The increased antibiotic contamination in the environment and the associated problems, such as the emergence of resistance, pose the necessity of developing new analytical methodologies to quantify antibiotics and their degradation products in order to broaden the knowledge about where and how resistance occurs. In this work, analytical methods for the simultaneous analysis of twenty-four antibiotics, three antifungals and their degradation products were developed in vegetables, soil:compost mixtures, animal manure and Eisenia foetida earthworms. The calculated limits of quantification were low enough to allow the detection of antibiotics in the different environmental compartments, demonstrating their accumulation in the food-chain.

Keywords: Antibiotics, transformation products, contamination, environment, liquid-chromatography, mass-spectrometry

1. Sarrera eta motibazioa

Antibiotikoak gizakien zein animalien ongizatea bermatzeko ezinbesteko sendagaiak izan dira, praktika klinikoan prebentziorako zein bakterio-infekzioak tratatzeko agente gisa erabiliz. Azken urteotan, ordea, gizarteak antibiotikoekiko duen kezka areagotu da, antibiotikoen etengabeko erabilera hedatuaren ondorioz beraien presentzia ingurumenean zeharo nabarmendu baita (García et al., 2020).

Edozein gizaki zein animaliak antibiotiko bat hartzen duenean, organismoek antibiotikoak partzialki baino ez dituzte metabolizatzen, eta, ondorioz, kontsumitutako antibiotikoen gehiena (% 30-90) gernuaren eta gorozkien bidez iraizten da (He et al., 2018; Scaria et al., 2021). Gizakiek antibiotikoak modu desegokian erabiltzeak (tratamendua erdira uztea, dosi

desegokiak hartzea edo gaizki agindutako hartualdiak, esaterako) edota abeltzaintzan hauen erabilera masiboek antibiotikoen presentzia ingurumenean areagotzen dute. Beste zenbait kutsatzaileekin batera, antibiotikoak hirietako ur-araztegietara heltzen dira. Araztegietako irteerako urak antibiotikoak ingurumenera heltzeko beste bide bat direla ere esan daiteke. Ur horietan maiz detektatu izan dira antibiotikoak, araztegietan erabiltzen dituzten tratamenduak ez baitiria guztiz eraginkorrak antibiotikoak ezabatzeko. Bestalde, hiri-araztegiko lohiak eta animalia-jatorriko azpiproduktuak (simaurra, minda, konposta) nekazaritza-lurzoruetan ongarri organiko gisa erabiltzeak sustatu dezake antibiotikoen sarrera nekazaritzarako erabiltzen diren zoruetan (Feng et al., 2018; He et al., 2018), eta bertatik, landare eta barazkietara hel daitezke, elikadura-katean sartuz (Boxall et al., 2006; Kang et al., 2013).

Antibiotikoak kontsumitzen direnetik ingurumeneko matrize ezberdinetara heltzen diren arte zenbait eraldaketa jasan ditzakete ingurumen-baldintzen (tenperatura, argi-erradiazioa, etab.) edota mikrobioen jardueraren ondorioz. Beraz, jatorrizko antibiotikoaz gain ezinbestekoa bilakatzen da antibiotikoen metabolizazio eta transformazio produktuen jarraipena egitea, azken hauek jatorrizko antibiotikoa baino toxikoagoak izan baitaitezke. Hala ere, oraindik ez dira guztiz ezagunak hondakin horien zeharkako esposizioak eragindako ondorio kaltegarriak zeintzuk diren (Lillenberg et al., 2009).

Ingurune desberdinetan, antibiotikoak bakterio anitzekin kontaktuan egoten dira. Antibiotikoak bakterioak hiltzeko kontzentraziotik behera daudenean, bakterioek hauekiko erresistente bilakatzeko mekanismoak garatzeko gai dira eta gainerako bakterioen artean barreiatzen dituzte (Cycoń et al., 2019; Kristiansson et al., 2011). Antibiotikoekiko erresistentziaren garapena gaur egungo arazo handienetako bat da, bereziki, erresistentzia anitzeko bakterioen sorrera dela eta. Izan ere, bakterio horiekin infektatuz gero, sendatzeko tratamendu eraginkorren gabezia dago (Gothwal & Shashidhar, 2015).

Ingurumenean antibiotikoen kontzentrazioa determinatzea garrantzitsua da, baina era berean, erronka bat da. Alde batetik, determinatu beharreko kontzentrazio maila: oro har, antibiotikoak kontzentrazio baxuetan (1 eta 1000 $ng \cdot L^{-1}$ arteko tarteak eta 1-1000 $pg \cdot g^{-1}$ lagin urtsu eta solidoetan, hurrenez hurren) aurkitzen dira ingurumeneko laginetan (ura, lurzorua, sedimentua, barazkiak,...). Bestalde, aztertu beharreko laginen konplexutasunak analisia zailtzen du. Azkenik, antibiotiko bakoitza ezaugarri fisiko-kimiko ezberdinak dituztenez, beraien aldibereko analisia zaila izaten da (Chuang et al., 2015; Yu et al., 2018). Hori dela eta, antibiotikoen aldibereko analisia bermatzen duten metodo analitiko sentikor, eraginkor eta zehatzak garatu behar dira. Helburu horri eutsi nahian, erauzketa eta garbiketa atalak optimizatzea garrantzia handikoa da, aurre-kontzentrazio handiena lortu, matrize-efektua minimizatu eta oso kontzentrazio baxuetan dauden antibiotiko eta produktu eratorriak determinatzeko. Konposatu hauen analisirako, likido kromatografia erabili ohi da, bereizmen baxuko masa-espektrometriari akoplatuta (LC-MS/MS) konposatu ezagunak determinatzeko, eta bereizmen handiko masa-espektrometriari (HRMS) akoplatuta konposatu ezagunak zein beraien metabolito eta transformazio produktuak determinatu nahi direnean (Larivière et al., 2017).

2. Arloko egoera eta ikerketaren helburuak

Ikerketa lan honetan antibiotikoak eta hauekiko erresistentzia ildo nagusi hartuta, giza osasunaren, abeltzaintzaren, elikaduraren eta ingurumenaren arteko loturak aztertu nahi dira. Testuinguru horretan, helburu nagusia da metodologia analitikoa garatzea, antibiotikoak eta degradazio-produktuak identifikatzeko, ingurunean gehien atzematen diren antibiotikoak zenbatesteko eta horiek ingurumenean izateak eragiten dituen ondorioak aztertzeko. Horretarako, hiru helburu nagusi ezarri dira:

1) Konpostean, lurzoruetan, laboreetan eta ur-inguruneetan antibiotikoen presentzia ebaluatzeko azterketa-metodo gidatuak garatzea. Horretarako, erauzketa-, aurre-konzentrazio- eta LC-MS/MS bidezko analisiak optimizatu eta balioztatuko dira.

2) Metodo ez-zuzenduak garatzea, antibiotikoen hondakinak (degradazio produktuak) xehetasunez identifikatzeko, degradazio-prozesuak eta ingurunean duten iraunkortasuna ulertzeko. Horretarako, lan-fluxuak eta informazioaren tratamenduko fluxuak aplikatuko dira, LC-HRMS bidez analisiak eginda.

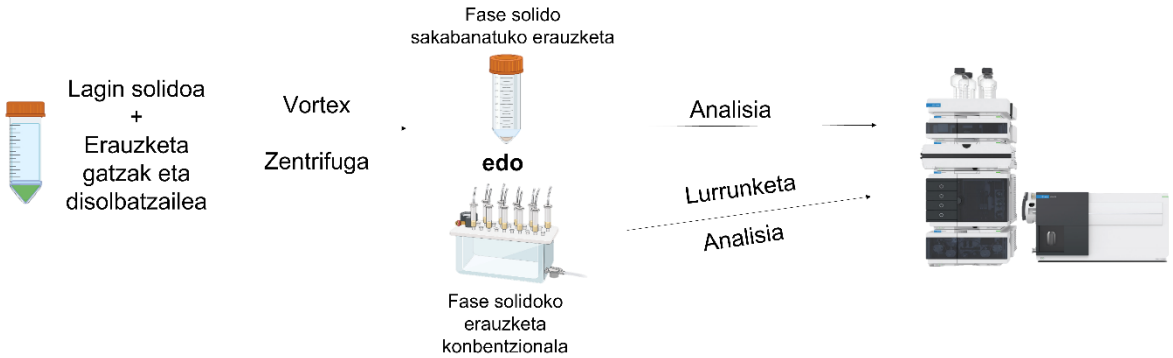
3) Ingurumenean bildutako laginak analizatzea balioztatutako metodo analitiko bideratu eta ez-bideratuak erabilita. Honekin, EAE-an antibiotikoek duten egungo hedapena zein den aztertu eta antibiotikoekiko erresistentziarekin erlazionatu nahi da.

3. Ikerketaren muina

Lan honetan, zortzi familia kimikoko hogeita-lau antibiotiko (makrolidoak, bentzimidazolak, diaminopirimidinak, fluorokinolonak, imidazolak, sulfamidak eta sulfonamidak, tetraziklinak eta triazolak) eta hiru fungiziden aldibereko determinazioa ahalbidetzen duten metodo analitikoak garatu eta balioztatu dira barazkietan (letxuga, tomate, azenario eta tipula), lurzoru:konpost nahasteetan, simaurrean eta *Eisenia foetida* zizareetan.

Matrize solidoen kasuan (1.Irudia), antibiotikoen erauzketarako erabilitako estrategia orokorra solido-likido erauzketan oinarritzen den QuEChERS (*Quick Easy, Cheap, Effective, Rugged* and *Safe* delakoa) metodologia erabiltzea izan da, hain zuzen. Erauzketaren ondoren, erauzien garbiketa egin da fase solidoko erauzketa konbentzionala edo sakabanatuaren bitartez. Azkenik analisia LC-MS/MS bidez egin da.

1.Irudia. Lagin solidoen analisirako metodo analitikoa.



Antibiotikoen galerak metodoan zehar trazagarrien bidezko edo matrizean egindako kalibratuaren bidez zuzendu dira, kasuan kasu, metodoaren zehaztasuna bermatuz. Horretaz gain, kuantifikazio muga baxuak lortu dira (1.Taula). Garatutako metodo analitikoak ingurumeneko laginetan antibiotikoak determinatzeko erabili dira.

1.Taula. Matrize bakoitzean antibiotiko eta antifungiko bakoitzaren kuantifikazio-muga.

	Kuantifikazio mugak (µg·kg^{-1})						
	Lurzoru:konpost	Simaurra	Zizarea	Letxuga	Tomate	Azenarioa	Tipula
Sulfamidak eta sulfonamidak	0,5-7,5	0,3-2,9	1,5-3,9	0,1-1,2	0,1-0,5	0,1-1,0	0,1-1,3
Tetraziklinak	2,0-4,3	2,6-3,2	2,5-3,4	0,3-0,7	0,8-1,1	0,2-3,7	0,4-1,0
(Fluoro)kinolonak	5,8-9,9	1,2-15,8	1,6-9,6	0,5-4,9	0,5-3,4	0,5-10,0	0,7-3,2
Makrolidoak	1,3-7,3	0,3-2,2	1,9-10,3	0,2-2,2	0,2-2,3	0,2-2,1	0,1-3,3
Tiabendazol	4,7	0,9	3,3	0,9	0,5	0,6	0,6
Trimetoprima	1,1	2,0	1,4	0,2	0,5	0,2	0,3
Flukonazol	2,4	0,9	5,6	1,5	1,2	0,7	0,9
Azido mikofenolikoa	4,7	2,1	1,9	2,2	0,6	1,0	0,3
Mikonazol	0,7	2,1	3,4	1,1	0,6	1,6	0,5

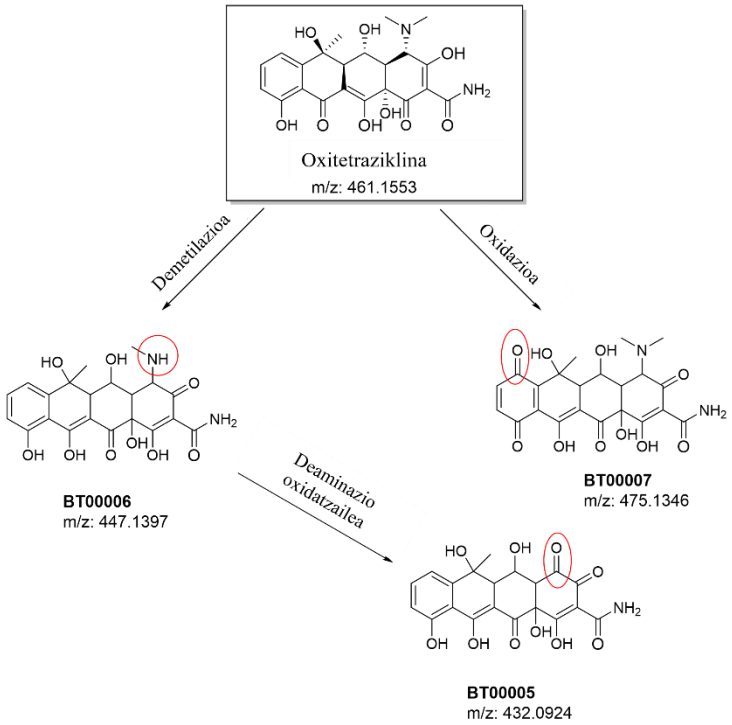
Barazki-laginei dagokienez, laborantza ekologiko eta konbentzionaleko letxuga, tomate, azenario eta tipularen hogeita-lau lagin aztertu ziren, EAE-ko hipermerkatu, supermerkatu eta merkatuetan batutakoak (Vergara-Luis et al., 2022). Bi sulfonamida detektatu ziren lagin horietan, horien kontzentrazioa < 1 µg·kg^{-1} izanik. Kontzentrazio horiek Munduko Osasun Erakundeak ezarritako eguneko irenste-atalasea gainditzen ez dutenez (50 µg gorputz kg bakoitzeko), euskal eskualdean landatutako barazkiak antibiotikoz libre daudela ondoriozta daiteke.

Bestalde, Bizkaian, Gipuzkoan, Araban eta Nafarroan kokatutako Idiazabal izeneko gazta-ekoizpeneko lurzoru-laginak eta ardi-simaurra ere aztertu ziren, baita bildutako lurzoruaren zatikiaren azalean hazitako landare-espezieak ere. Aipatutako matrize guztien artean, espero bezala, simaurrean aurkitu ziren antibiotiko kontzentrazio altuenak. Zehazki, bi sulfonamida (sulfadiazina eta sulfametazina), bi tetraziklina (oxitetraziklina eta klortetraziklina) eta fluorokinolona bat (enrofloxazina) detektatu ziren 1,7-93,3 µg·kg^{-1} kontzentrazio-tartean. Lurzoru-laginei dagokienez, sulfametazina, trimetoprima eta danofloxazina detektatu ziren, 7,9 µg·kg^{-1}, 4,9 µg·kg^{-1} eta 27,1 µg·kg^{-1} kontzentrazioetan, hurrenez hurren. Azkenik, belar laginetan lurzoru eta simaurrean detektatutako antibiotiko familia berak behatu ziren, bereziki handia izanik kasu honetan tetraziklinaren kontzentrazioa, 56,8 µg·kg^{-1}. Lagin hauetan determinatutako antibiotiko kontzentrazio nabarmena kontuan hartuta, transformazio produktuen analisia ere egin nahi izan da LC-HRMS erabilita. BioTransformer 3.0 software-a erabiliz, antibiotiko bakoitzak jasan zezakeen degradazio-erreakzio desberdinak (abiotikoak edo biotikoak) aztertu ziren eta produktuak susmagarrien zerrenda batean bildu ziren, guztira 22.281 izanik. Araban batutako simaur lagin batean, bakterioen kontrako ezaugarriak dituzten beste konposatu batzuen artean (propikonazola, piperonilonitriloa eta brefeldin A, esaterako) sulfametazinaren degradazio produktu bat, formil-sulfametazina, aurkitu zen.

Zoruan ematen diren antibiotikoen degradazio prozesuetan gehiago sakondu nahian, lurzoru:konpost nahastea abeltzaintzan gehien erabilienetarikoa den oxitetraziklina antibiotikoarekin dopatu zen, 1 mg·kg^{-1} eta 150 mg·kg^{-1} kontzentrazioetan. Hilabete batez mantendu ziren dopatutako lagin hauek tenperatura eta hezetasun baldintza kontrolatuetan, eta

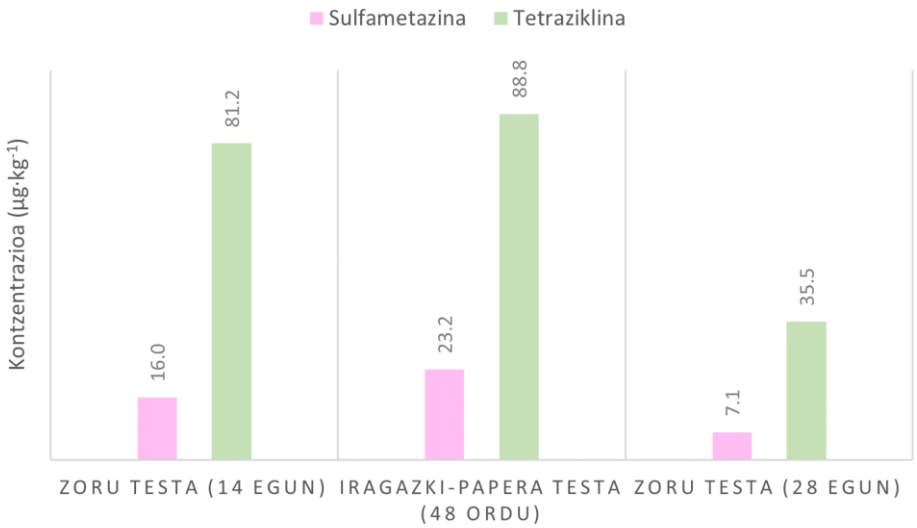
esperimentuko 1, 9, 19 eta 30 egunetan laginak jaso ziren denboran zehar sor zitezkeen degradazio produktu ezezagunen azterketa egiteko. Konkretuki, hiru degradazio produktu aurkitu ziren (2.Irudia).

2. Irudia. Identifikatutako oxitetraziklinaren degradazio produktuak zoru:konpost nahastean.



Azkenik, zizare laginei dagokionez, hauek sulfametazina eta tetraziklina antibiotikoen kontzentrazio desberdinen eraginpean jarri ziren bi OECD (207 eta 222) esperimentu eginez. Lehenengo esperimentua zizareek lurzorua irenstean metatu dezaketen antibiotiko kantitatea determinatzeko diseinatu zen. Horretarako, antibiotiko kontzentrazio ezberdinak zituzten (0, 10, 100 eta 1000 $mg \cdot kg^{-1}$) zoruetan jarri ziren zizareak eta hamalau eta hogeita-zortzi egunen ondoren zizareak aztertu ziren. Emaitzen arabera, antibiotikoen kontzentrazio handiagoa behatu zen hamalau egun ondoren bildutako zizareetan, ziurrenik epe-luzeagoetan antibiotikoen degradazioa gertatzen delarik (ikus 3. Irudia). Bigarren esperimentu batean, berriz, zizareek azalaren bitartez akumulatu zezaketen antibiotiko kontzentrazioa determinatu nahi zen. Horretarako, 0, 5, 50, 500 eta 1000 $mg \cdot L^{-1}$ kontzentrazioa zuten iragazki-paperean kokatu ziren zizareak berrogeita-zortzi orduz. Lurzoru kutsatuaren eraginpean hamalau egunez egondako zizareetan pilatutako antibiotikoen kontzentrazioak, kutsatutako iragazki-paperaren eraginpean berrogeita-zortzi orduz egon zirenetan detektatutakoekiko estatistikoki berdinak zirela ikusi zen. Hortaz, zizareek antibiotikoak azaleko xurgapenaren bidez bizkorrago sartzen dituztela ondoriozta daiteke.

3.Irudia. OECD esperimentuen ondoren zizareetan detektatutako antibiotiko kontzentrazioa.



4. Ondorioak

Antibiotiko hondakinek eta hauen degradazio-produktuek erresistentzien sorrerarako presioa egiten dute, hortaz, garrantzitsua da antibiotikoak ingurumenean duten hedapena kuantifikatzeko metodologia analitikoak eskura izatea. Lan honetan hogeita-lau antibiotiko, hiru fungizida eta hauen degradazio-produktuak aldi berean analizatzeko metodo analitikoak optimizatu eta balioztatu dira zenbait ingurumeneko laginetan. Orokorrean antibiotikoen ezaugarri fisiko-kimiko desberdinak hauen aldi bereko analisia zailtzen dutenez, lan honek aurrerapauso nabarmena suposatzen du. Balioztatutako metodoen sentikortasuna ingurumenean kontzentrazio baxuan aurkitzen diren antibiotikoen kuantifikazioa bermatu du eta hauen kutsadura elikadura-katean zehar egiaztatuta geratu da. Izan ere, behatu da nekazaritzan antibiotikoak izan ditzakeen simaurrak ongarri gisa erabiltzen badira, antibiotiko horiek landare eta organismo lurtarretan metatu daitezkeela. Hortaz, garrantzitsua da aztertzea antibiotikoen eta hauen degradazio produktuek epe-luzean eragin ditzaketen efektuak.

5. Etorkizunerako planteatzen den norabidea

Lan honetatik abiatuta lurzoruetan antibiotiko gehiagoren degradazio erreakzioak aztertzen jarraitu nahi da bakoitzaren degradazio-produktu espezifikoak identifikatzeko. Horretaz gain, ur laginen analisian ere sakondu nahi da. Orain arte araztegietako irteerako uren eta itsaso- eta estuario- uretarako metodoak balioztatu dira, fase solidoko erauzketa konbentzionalaren bitartez. Garatutako metodoen sentikortasuna hobetu nahi da erauzketa teknika desberdinak frogatuz, hala nola, adsorbatzaile paketatuaren bidezko mikro-erauzketa (MEPS delakoa), egitura metal-organikoen bidezko erauzketa (MOFs delakoa), edota antigorputz espezifikoak dituzten irabiagailu magnetikoen bitartezko erauzketak eginez.

6. Erreferentziak

Boxall, A. B. A., Johnson, P., Smith, E. J., Sinclair, C. J., Stutt, E., & Levy, L. S. (2006). Uptake of Veterinary Medicines from Soils into Plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *54*(6), 2288-2297. https://doi.org/10.1021/jf053041t

Chuang, Y.-H., Zhang, Y., Zhang, W., Boyd, S. A., & Li, H. (2015). Comparison of accelerated solvent extraction and quick, easy, cheap, effective, rugged and safe method for extraction and determination of pharmaceuticals in vegetables. *Journal of Chromatography A*, *1404*, 1-9. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2015.05.022

Cycoń, M., Mrozik, A., & Piotrowska-Seget, Z. (2019). Antibiotics in the Soil Environment—Degradation and Their Impact on Microbial Activity and Diversity. *Frontiers in Microbiology*, *10*, 338. https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00338

Feng, Y., Zhang, W.-J., Liu, Y.-W., Xue, J.-M., Zhang, S.-Q., & Li, Z.-J. (2018). *A Simple, Sensitive, and Reliable Method for the Simultaneous Determination of Multiple Antibiotics in Vegetables through SPE-HPLC-MS/MS*. 13.

García, J., García-Galán, M. J., Day, J. W., Boopathy, R., White, J. R., Wallace, S., & Hunter, R. G. (2020). A review of emerging organic contaminants (EOCs), antibiotic resistant bacteria (ARB), and antibiotic resistance genes (ARGs) in the environment: Increasing removal with wetlands and reducing environmental impacts. *Bioresource Technology*, *307*, 123228. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123228

Gothwal, R., & Shashidhar, T. (2015). Antibiotic Pollution in the Environment: A Review: Antibiotic Pollution in the Environment. *CLEAN - Soil, Air, Water*, *43*(4), 479-489. https://doi.org/10.1002/clen.201300989

He, Z., Wang, Y., Xu, Y., & Liu, X. (2018). Determination of Antibiotics in Vegetables Using QuEChERS-Based Method and Liquid Chromatography-Quadrupole Linear Ion Trap Mass Spectrometry. *Food Analytical Methods*, *11*(10), 2857-2864. https://doi.org/10.1007/s12161-018-1252-8

Kang, D. H., Gupta, S., Rosen, C., Fritz, V., Singh, A., Chander, Y., Murray, H., & Rohwer, C. (2013). Antibiotic Uptake by Vegetable Crops from Manure-Applied Soils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *61*(42), 9992-10001. https://doi.org/10.1021/jf404045m

Kristiansson, E., Fick, J., Janzon, A., Grabic, R., Rutgersson, C., Weijdegård, B., Söderström, H., & Larsson, D. G. J. (2011). Pyrosequencing of Antibiotic-Contaminated River Sediments Reveals High Levels of Resistance and Gene Transfer Elements. *PLOS ONE*, *6*(2), e17038. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017038

Kumar, K., Gupta, S. C., Baidoo, S. K., Chander, Y., & Rosen, C. J. (2005). Antibiotic Uptake by Plants from Soil Fertilized with Animal Manure. *Journal of Environmental Quality*, *34*(6), 2082-2085. https://doi.org/10.2134/jeq2005.0026

Larivière, A., Lissalde, S., Soubrand, M., & Casellas-Français, M. (2017). Overview of Multiresidues Analytical Methods for the Quantitation of Pharmaceuticals in Environmental Solid Matrixes: Comparison of Analytical Development Strategy for Sewage Sludge, Manure, Soil, and Sediment Samples. *Analytical Chemistry*, *89*(1), 453-465. https://doi.org/10.1021/acs.analchem.6b04382

Lillenberg, M., Yurchenko, S., Kipper, K., Herodes, K., Pihl, V., Sepp, K., Lõhmus, R., & Nei, L. (2009). Simultaneous determination of fluoroquinolones, sulfonamides and tetracyclines in sewage sludge by pressurized liquid extraction and liquid chromatography electrospray ionization-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, *1216*(32), 5949-5954. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.06.029

Pan, M., & Chu, L. M. (2017). Transfer of antibiotics from wastewater or animal manure to soil and edible crops. *Environmental Pollution*, *231*, 829-836. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.08.051

Scaria, J., Anupama, K. V., & Nidheesh, P. V. (2021). Tetracyclines in the environment: An overview on the occurrence, fate, toxicity, detection, removal methods, and sludge management. *Science of The Total Environment*, *771*, 145291. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.145291

Vergara-Luis, I., Báez-Millán, J. C., Baciero, I., González-Gaya, B., Olivares, M., Zuloaga, O., & Prieto, A. (2022). Comparison of conventional and dispersive solid phase extraction clean-up approaches for the simultaneous analysis of tetracyclines and sulfonamides in a variety of fresh vegetables. *Talanta*, 124192. https://doi.org/10.1016/j.talanta.2022.124192

Yu, X., Liu, H., Pu, C., Chen, J., Sun, Y., & Hu, L. (2018). Determination of multiple antibiotics in leafy vegetables using QuEChERS-UHPLC-MS/MS. *Journal of Separation Science*, *41*(3), 713-722. https://doi.org/10.1002/jssc.201700798

Zhao, F., Chen, L., Yang, L., Li, S., Sun, L., & Yu, X. (2018). Distribution, dynamics and determinants of antibiotics in soils in a peri-urban area of Yangtze River Delta, Eastern China. *Chemosphere*, *211*, 261-270. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.07.162

7. Eskerrak eta oharrak

Egileek eskertu egiten dute “Emergencia y diseminación de resistencia a los antibióticos: vínculos entre salud humana, ganadería, alimentación y medioambiente (Elkartek 20/88)” eta “Evaluación del riesgo de aparición y diseminación de resistencias a antibióticos en productos vegetales frescos y suelos de cultivo de la comunidad autónoma del País Vasco (PA21/05 and PA22/03)” proiektuen bitartez jasotako finantza-laguntza. Egileek eskertu egiten dute, halaber, Euskal Herriko Unibertsitatearen (UPV/EHU) laguntza finantzarioa “Assessment and preliminary diagnosis of dissemination of antibiotic resistance genes through the food production chain in the Basque Country” COLAB 20/14 lankidetza-proiektuaren bitartez jasotakoa; eta Eusko Jaurlaritza Ikerketarako Euskal Sistemaren talde finkatu gisa emandako finantza-laguntzagatik (IT1446-22 and IT1682-22). I. Vergara-Luis EHU/UPV-ri eskertzen dio bere doktoregai beka.

Nano-zuntz berri eta erabilgarrien fabrikazioa *electrospinning* jasangarriaren bidez

Mario Martinez, Edurne González

POLYMAT, Kimika Aplikatua Saila, Kimika Fakultatea, Euskal Herriko Unibertsitatea UPV/EHU, Joxe Mari Korta Zentroa, Tolosa Hiribidea 72, 20018 Donostia

mario.martinez@polymat.eu

Laburpena

Lan honetan partikula tamaina ezberdineko metil metakrilato (MMA) eta butil akrilato (BA) latexak harilkatu dira *electrospinning* jasangarriaren bitartez polibinil alkohola (PVA) matrize polimeriko bezala erabilita. Hainbat teknika erabiliz, biskositatearen azterketa, *Ekorketa Bidezko Mikroskopio Elektroniko* (SEM) bidezko irudiak…ikusi da partikula tamainak, PVA kopuruak eta solido edukiak zuzenean eragiten diotela zuntzaren tamaina eta morfologian.

Hitz gakoak: *Electrospinning* jasangarria, latex zuntzak, PVA

Abstract

In this work methyl methacrylate (MMA) and butyl acrylate (BA) latexes with different particle sizes are spun by green electrospinning using poly (vynil alcohol) (PVA) polymer as a template. Using different techniques, analysis of viscosity, pictures by Scanning Electron Microscope (SEM)…it was observed that the particle size, PVA amount and solid content have a direct impact on the size and morphology of the nanofibres.

Keywords: Green electrospinning, latex fibres, PVA

1. Sarrera eta motibazioa

Electrospinning (zuntzen elektro biraketa) eremu elektriko baten bidez ehunka nanometroko diametroa duten zuntzak lortzeko metodo moderno eta efiziente bat da. Metodo honen bidez lortutako zuntz ultra-finak ezaugarri bikainak dituzte, azalera bolumen erlazio izugarria, egitura porotsua, edo funtzionaltasun moldagarria esate baterako. Material hauek duten ezaugarriei esker aplikazio askotan erabilgarriak izan daitezke, ehun, filtro, medikamentu banaketan, zaurien sendaketan, sentsore, ingurumenaren sendabide edo katalizatzaile bezala beste batzuen barruan. (Toriello et al., 2020; Xue et al., 2019)

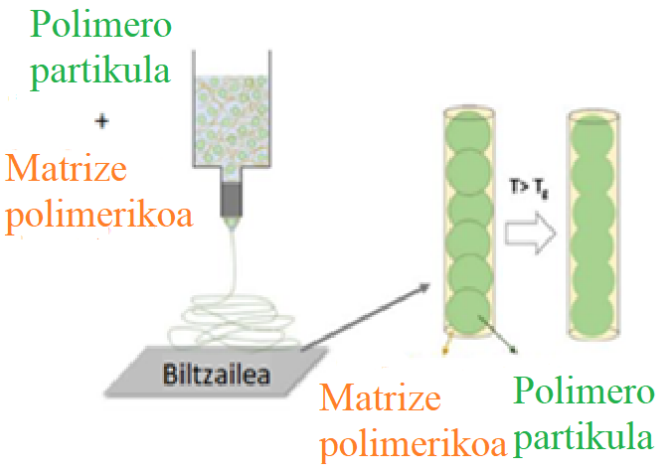
Gaur egun, gehien erabiltzen den *electrospinning* metodoa soluzio bidezkoa da; hala ere, aplikazio industrialetarako desabantaila nagusi batzuk ditu. Lehenik eta behin, organikoak diren disolbatzaile toxiko eta sukoien erabilera, problematikoak izan daitezkeelako produkzio industrialean ingurumen eta segurtasun arauketengatik. Honi aurre egiteko, ura erabili daiteke disolbatzaile bezala, baina uretan disolbagarriak diren polimeroak soilik harilkatu daitezke eta hau, desabantaila bat izan daiteke zenbait erabileretarako. Bigarren muga disoluzioan erabilitako polimeroaren kontzentrazioarekin erlazionatuta dago. Soluzio *electrospinning* bidez erabiltzen diren polimero disoluzioen kontzentrazioak %10-15 izaten da gehienez. Kontzentrazio altuagoak erabiliz gero, haril ezina den disoluzio oso likatsua lortzen da. Kontzentrazio muga honek produktibitatea nabarmenki murrizten du. (Agarwal eta Greiner, 2011)

Suspentsio *electrospinning* (edo *electrospinning* jasangarria) polimero dispertsio urtsu batean oinarritutako metodo berria da. Prozesu honetan polimero dispertsio urtsu bat (latex ere deitua) hariltzen da matrize polimeriko baten laguntzarekin (uretan disolbagarria den polimeroa). Metodo

honek ura erabiltzen duenez ingurune bezala *electrospinning* prozesurako, lehen aipatutako desabantailei aurre egiten die. Ez hori bakarrik, polimero kontzentrazio handiagoak erabili daitezke eta beraz, prozesuaren produktibitatea asko handitu daiteke. (Agarwal eta Greiner, 2011; Crespy et al., 2012; Gonzalez et al., 2021)

Matrize polimerikoa beharrezkoa da polimero kateak katramilatzeko zuntzen formazioan zehar, gainera, itsasgarri bezala jokatzen du polimero partikula artean. *Electrospinning* prozesuaren bukaeran, polimero partikulak zuntzek osatzen duten matrize polimerikoaren barruan paketatuko dira. Polimero partikulen beira trantsizio tenperatura (Tg) giro tenperatura baino baxuagoa bada, koaleszentzia jasango dute fase jarrai bat sortuz. Bestalde, polimeroaren Tg-a giro tenperatura baino handiagoa bada, partikulak esfera itxura mantenduko dute (1. irudia). Nahi izanez gero matrize polimerikoa zuntzetik kendu daiteke, zuntzak uretan sartuz. (Buruaga et al., 2010; Yuan eta Zhang, 2012)

1. irudia. *Electrospinning* jasangarria azaltzeko diagrama eta zuntzen formazioa



Harilkatzen den nahastearen biskositateak lortzen den zuntzen morfologian eragin zuzena duela ikusi da literatura. Nahastearen biskositatea handitzean, zuntz homogeneoagoak lortzen dira. Nahastearen biskositatea, matrize polimerikoaren masa molekularra eta kopurua aldatuz, solido edukia aldatuz edo tamaina ezberdineko partikulak erabiliz aldatu daiteke. Beraz aldagai hauek guztiak eragin zuzena izango dute lortzen den zuntzaren morfologian. (Gonzalez et al., 2021)

2. Arloko egoera eta ikerketaren helburuak

Electrospinning jasangarriaren inguruko lehen lana Greiner eta lankideek argitaratu zuten 2007-an, geroztik lan ezberdinak atera dira matrize polimeriko/partikula ratio, partikula tamainak edo Tg-a balioak aldatuta. Hala ere, literaturan lan gutxi daude hasierako latexaren konposizioak, bukaeran lortzen diren zuntzen morfologian duen eragina sakon aztertu eta ulertzen dutenak. (Stoiljkovic et al., 2007)

Lan honetan, partikula tamaina ezberdineko metil metakrilato/butil akrilato MMA/BA latexak erabili dira eta polibinil alkohola (PVA) erabili da matrize polimeriko bezala. Helburu ezberdinak egon dira, alde batetik partikula tamainak zuntzaren morfologian duen eragina aztertzea. Bestalde. PVA/partikula ratioak eta solido edukiaren eragina zuntzaren morfologian eta azkenik nahastean erabilitako PVA kopurua ahalik eta gehien murriztea.

3. Ikerketaren muina

3.1. Atal esperimentala

Lan honetan emultsio polimerizazioz sintetizatutako hiru latexekin lortutako nano-zuntzen ezaugarrien analisia egin da. Horretarako, *electrospinning* prozesua egin ondoren aurrerago azaltzen diren teknikak erabiliz zuntzak aztertu dira.

3.1.1. Materialak

Partikula tamaina ezberdineko hiru MMA/BA latex erabili dira % 40 solido edukiarekin (1. taula). Mowiol 47-88 (PVA, Sigma-Aldrich) erabili da matrize polimeriko bezala, honen masa molekularra 138900 g/mol izanda. Ur destilatua erabili da nahaste guztien prestakuntzarako.

1. taula. MMA/BA latexak

Izena	Polimero partikulen batez besteko diametroa (nm)
L-100	100
L-200	200
L-300	300

3.1.2. *Electrospinning*-erako erabili diren nahasteen prestaketa

PVA/partikula eta solido eduki ezberdineko nahasteak prestatu dira. Horretarako, 250 ml-ko erreaktore batean latexa, PVA ur disoluzioa (% 10 masan) eta ur destilatua sartu eta 200 rpm-tan nahastu dira 15 minutuz.

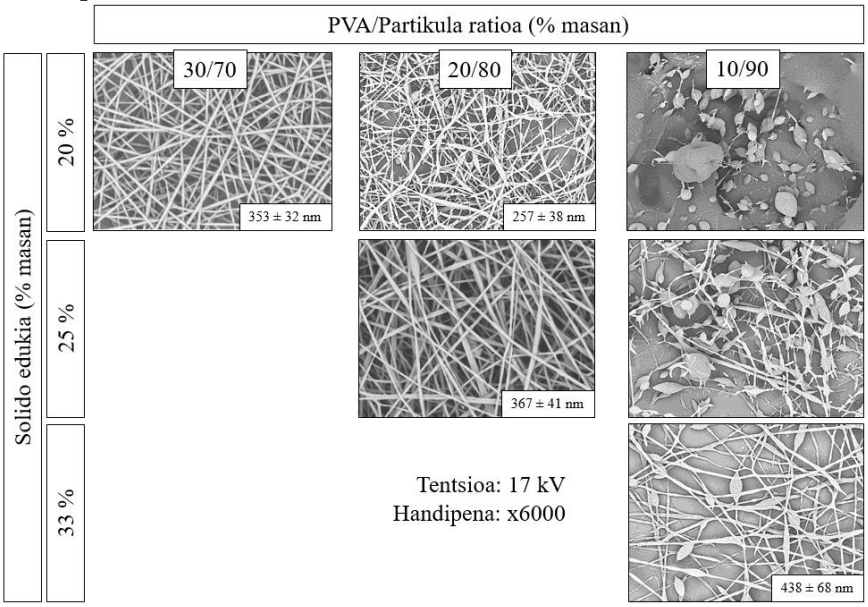
3.1.3. Karakterizazioa

Lortutako nahasteen biskositatea neurtu da 0,001-1000 s^{-1}-eko biratze abiaduran geometria zilindrikoa duen erreometroa (AR 1500) erabiliz. *Electrospinning* bidez lortutako zuntzen morfologiak *Ekorketa Bidezko Mikroskopio Elektronikoa* (SEM) erabiliz aztertu da. Zuntzen batez besteko diametroa kalkulatzeko 50 neurketa egin dira lagin bakoitzeko. Neurketa hauek laginaren gune ezberdinetan ateratako hiru irudietan egin dira ImageJ software-a erabilita.

3.2 Emaitzak eta ondorioak

Lehenik eta behin hiru PVA/partikula ratio ezberdinak dituzten laginak harilkatu eta aztertu dira: 30/70, 20/80 eta 10/90. Erabilitako latexa L-200 izan da. 2. irudian SEM erabiliz lortutako zuntzen irudiak agertzen dira.

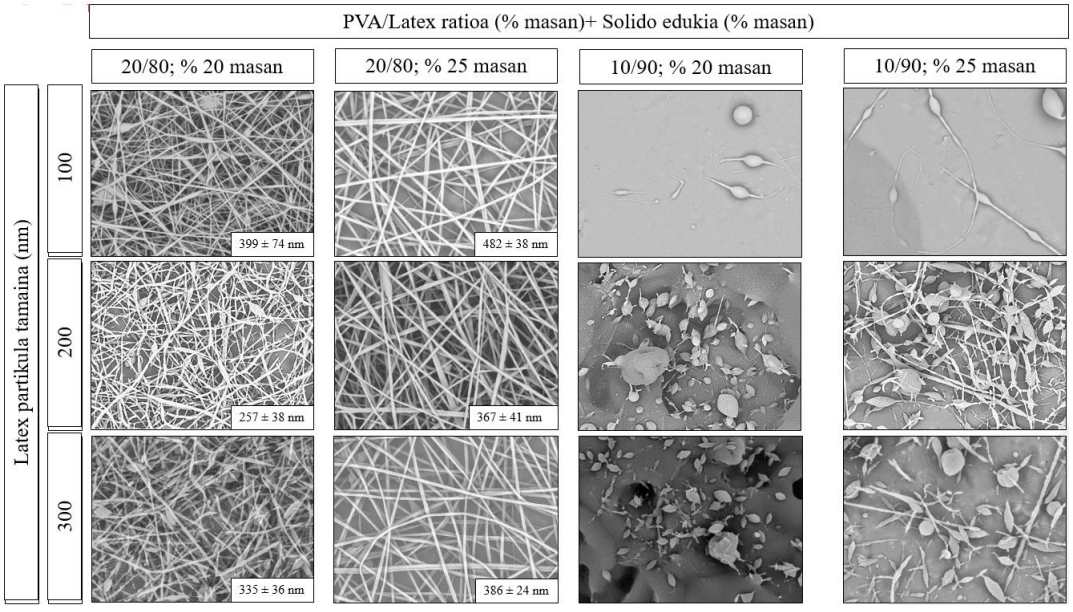
2. irudia. PVA/partikula ratio eta solido eduki ezberdinekin lortutako zuntzen SEM irudiak



Ikusi daitekeen bezala, solido eduki baterako, PVA kopurua handitzean zuntz homogeneoak lortu dira. Honen arrazoia PVA kopurua handitzean harilkatuko den nahastearen biskositatea handitzen dela da. Gainera, geroz eta PVA kantitatea handiagoa izan, solido eduki konstante batean, lortutako zuntzen diametroa handitzen da. Bestalde, PVA/partikula ratioa konstante mantentzean (20/80) eta solido edukia igotzean zuntzen morfologia hobetzen da eta diametroa handitzen da. PVA/partikula 10/90 ratioan, nahiz eta solido edukia asko igo, ezin izan da zuntzen morfologia homogeneoa lortu. Honen arrazoia harilkatu den nahastearen biskositate falta izan daiteke, izan ere, zuntzak lortzeko nahasteak biskositate minimo bat izan behar dute, 0,13-0,24 Pa·s tartean (200 s^{-1}-tan neurtuta), hortik beherako biskositatea duten nahasteek morfologia ez homogeneoko zuntzak sortzen dituzte.

Esperimentu berdina errepikatu da beste partikula tamainako latexekin, lortutako emaitzak 3. irudian agertzen dira.

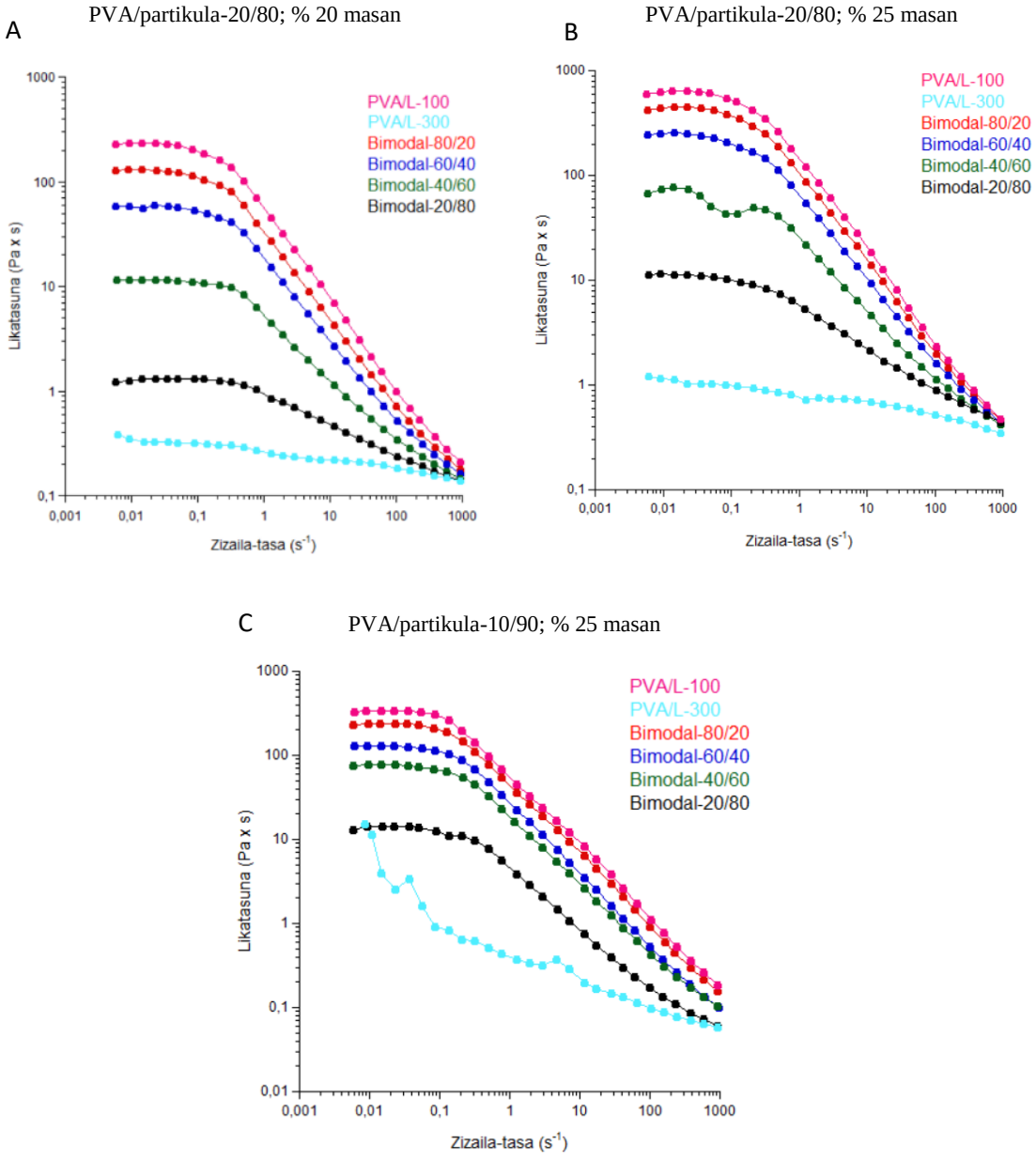
3. irudia. Partikula tamaina ezberdineko latexak erabiliz lortutako zuntzak. PVA/partikula ratio eta nahastearen solido edukia aldatuz



Irudiak aztertuz, PVA/partikula ratioa 20/80 den kasuan, solido edukia handiagoa denean zuntzen diametroa handitzen da eta gainera morfologian hobekuntza nabaritzen da. Partikula tamainaren eragina aztertuz, zuntzen diametroak analizatuz ez da ikusten erlazio zuzenik partikula tamaina eta zuntzen diametroaren artean. Bi solido edukietan, zuntz lodienak L-100 latexarekin lortu dira. L-200 latexa erabiltzean zuntzen diametroa txikitu egiten da eta L-300 erabiltzean berriz ere handitu. Bestalde, PVA kantitatea % 10-era jaisten bada zuntzen morfologia galtzen da nahiz eta solido edukia % 25-era igo.

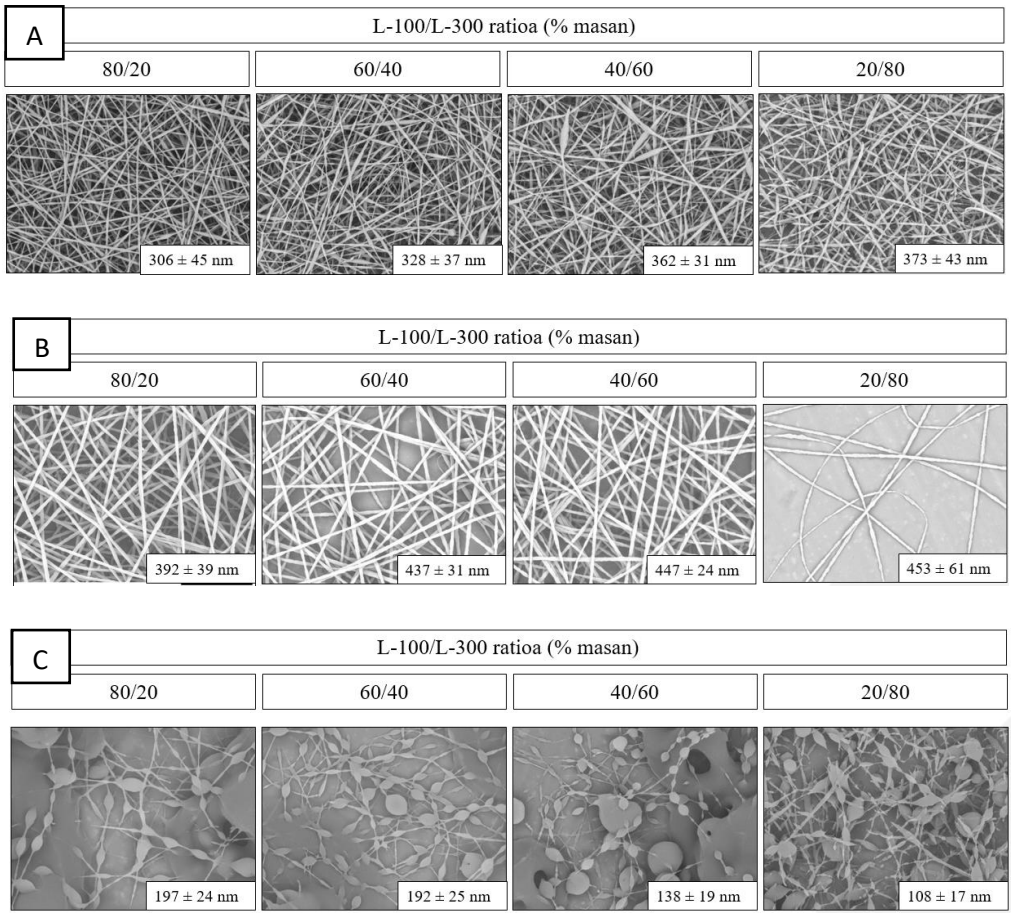
Latex bimodalen eragina zuntzen morfologian ere aztertu da. Horretarako L-100 eta L-300 latexak nahastu eta lau latex bimodal lortu dira. L-100/L-300 ratio ezberdinak erabili dira: 80/20, 60/40, 40/60 eta 20/80 (% partikula masan). Latex bimodal hauek PVA disoluzioarekin nahastu dira 20/80 eta 10/90 PVA/partikula ratioan eta %20 eta % 25 solido edukiekin. 4. irudian latex bimodalekin lortutako nahasteen biskositateak biratze abiaduraren aurrean erakusten dira.

4. irudia. PVA/partikula bimodalekin lortutako biskositateak



Grafikoak aztertuta ondorio nagusi bat atera daiteke, latex bimodalen biskositateak bi latex monomodalen biskositateen artean daude. Hiru kasuetan PVA/L-100 nahasteak biskositate altuena dauka, eta aurkakoa gertatzen da 300 nm-ko partikulak dituen nahasteekin, biskositate txikienak lortuz. Latex bimodalen artean, L-100 latexaren ratioa handitzean biskositatea handiagoa izango du nahasteak. 5. irudian *electrospinning* eta gero lortutako zuntzak ikus daitezke.

5. irudia. Latex bimodalekin lortutako zuntzak. (A)- 20/80 PVA/partikula ratioa, % 20 solido edukia; (B) 20/80 PVA/partikula ratioa, % 25 solido edukia; (C) 10/90 PVA/partikula ratioa, % 25 solido edukia



PVA/partikula ratioa 20/80 duten laginak konparatuz gero hobekuntza nabarmena ikusten da nahaste monomodaletatik (3. irudia) bimodaletara (5. irudia). Ez hori bakarrik, bi solido edukietan (%20 eta %25) lortu diren zuntzen diametroa handitu egiten da L-300 kopurua handitzean nahiz eta nahastearen biskositatea txikitu. Bukatzeko, PVA kantitatea % 10-era jaitsi denean lortu diren zuntzen morfologia ez da homogeneoa izan nahiz eta solido edukia % 25 izan.

6. Ondorioak

Lan honetan MMA/BA kopolimeroz osatuko latex partikulak harilkatu dira PVA matrize polimeriko bezala erabiliz. Latexaren partikula tamaina, partikulen bimodaltasuna, PVA/partikula ratioa eta nahastearen solido edukia aldatu dira eta parametro huen eragina zuntzen morfologian aztertu da. Biskositateak zuntzen morfologian eragina zuzena duela ikusi da. PVA kopurua eta solido edukia handitzean, biskositatea handitzen da eta ondorioz zuntz homogeneagoak lortzen dira diametro handiagoekin. Partikula monomodalekin, ez dugu erlazio zuzen bat ikusi partikula tamaina eta zuntzen tamainaren artean. Partikula bimodalekin, zuntzen diametroa partikula txikien eta handien arteko ratioaren araberakoa dela ikusi dugu. Bukatzeko, erabili dugun PVA-

rekin, PVA kopurua % 10-era murriztean, biskositatea asko txikitzen da eta ondorioz ezin ditugu zuntz homogeneoak lortu.

7. Etorkizunean planteatzen den norabidea

Egindako lana oinarri moduan hartuta, interesgarria izango litzateke erabilitako PVA matrizearen masa molekularra handitzea, likatasun handiagoko nahasteak lortzeko eta PVA kopuru txikiagoa duten zuntzak lortzeko. Horrez gain, zuntzei PVA kentzean lortuko liratekeen zuntzen morfologia aztertzea interes handikoa izango litzateke.

8. Erreferentziak

Agarwal, S., & Greiner, A. (2011). On the way to clean and safe electrospinning-green electrospinning: emulsion and suspension electrospinning. *Polymers for Advanced Technologies, 22*(3), 372-378. 10.1002/pat.1883

Buruaga, L., Sardon, H., Irusta, L., González, A., Fernández-Berridi, M. J., & Iruin, J. J. (2010). Electrospinning of Waterborne Polyurethanes. *Journal of Applied Polymer Science, 115*(2), 1176-1179. 10.1002/app.31219

Crespy, D., Friedemann, K., & Popa, A. (2012). Colloid-Electrospinning: Fabrication of Multicompartment Nanofibers by the Electrospinning of Organic or/and Inorganic Dispersions and Emulsions. *Macromolecular Rapid Communications., 33*(23), 1978-1995. 10.1002/marc.201200549

Gonzalez, E., Barquero, A., Muñoz-Sanchez, B., Paulis, M., & Leiza, J. R. (2021). Green Electrospinning of Polymer Latexes: A Systematic Study of the Effect of Latex Properties on Fiber Morphology. *Nanomaterials (Basel, Switzerland), 11*(3), 706. 10.3390/nano11030706

Stoiljkovic, A., Ishaque, M., Justus, U., Hamel, L., Klimov, E., Heckmann, W., Eckhardt, B., Wendorff, J. H., & Greiner, A. (2007). Preparation of water-stable submicron fibers from aqueous latex dispersion of water-insoluble polymers by electrospinning. *Polymer (Guilford), 48*(14), 3974-3981. https://doi.org/10.1016/j.polymer.2007.04.050

Toriello, M., Afsari, M., Shon, H., & Tijing, L. (2020). Progress on the Fabrication and Application of Electrospun Nanofiber Composites. *Membranes (Basel), 10*(9), 204. 10.3390/membranes10090204

Xue, J., Wu, T., Dai, Y., & Xia, Y. (2019). Electrospinning and Electrospun Nanofibers: Methods, Materials and Applications. *Chemical Reviews, 119*(8), 5298-5415. https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.8b00593

Yuan, W., & Zhang, K. (2012). Structural Evolution of Electrospun Composite Fibers from the Blend of Polyvinyl Alcohol and Polymer Nanoparticles. *Langmuir, 28*(43), 15418-15424. 10.1021/la303312q

9. Eskerrak eta oharrak

Eskerrak Euskal Herriko Unibertsitateari (UPV/EHU) eta POLYMAT-eri laguntza ekonomikoarengatik. Baita nire zuzendariari, proiektua aurrera ateratzeagatik eta niri egiteko aukera emateagatik.

Epoxi ur-dispertsioak estaldura antikorrosiboetan

Alvaro del Castillo, Edurne González, Maria Paulis

POLYMAT, Kimika Aplikatua Saila, Kimika Fakultatea, Euskal Herriko Unibertsitatea UPV/EHU, Joxe Mari Korta Zentroa, Tolosa Hiribidea 72, 20018 Donostia

alvaroluis.delcastillo@ehu.eus

Laburpena

Lan honetan Bisfenol A-ko diglizidil eter-ez (DGEBA) osatutako epoxi erretxina likido baten ur-dispertsio bat aztertzen da, estaldura antikorrosibo aplikazioetan erabiltzeko asmoz. Teknika ezberdinak erabiliz (sonikazioa, DLS, EMN...) erretxina honen dispertsioak uretan lortu eta aztertu dira. Ikusi da erretxinaren likatasunak arazoak sor ditzakeela dispertsio prozesuan, erretxinaren hidrolisia ekidin daitekeela dispertsioaren pH-a neutroa bada eta azidoa bada, ordea, hidrolisia gertatzen dela.

Hitz gakoak: epoxi erretxina, polimero estireno/akriliko, estaldura, antikorrosioa, ur-dispertsioa, hidrolisia

Abstract

In this work, a water dispersion based on an epoxy resin composed of diglycidyl ether of Bisphenol A (DGEBA) is studied, for anticorrosive coating applications. By using different techniques (sonication, DLS, NMR…) dispersions of this resin were obtained and studied. It was observed that the viscosity of the resin can cause some problems in the dispersion process, that the hydrolysis of the resin can be avoided if the pH of the dispersion is neutral and that it is hydrolysed if it is acidic.

Keywords: epoxy resin, styrene/acrylic polymer, coating, anticorrosion, dispersion, hydrolysis

1. Sarrera eta motibazioa

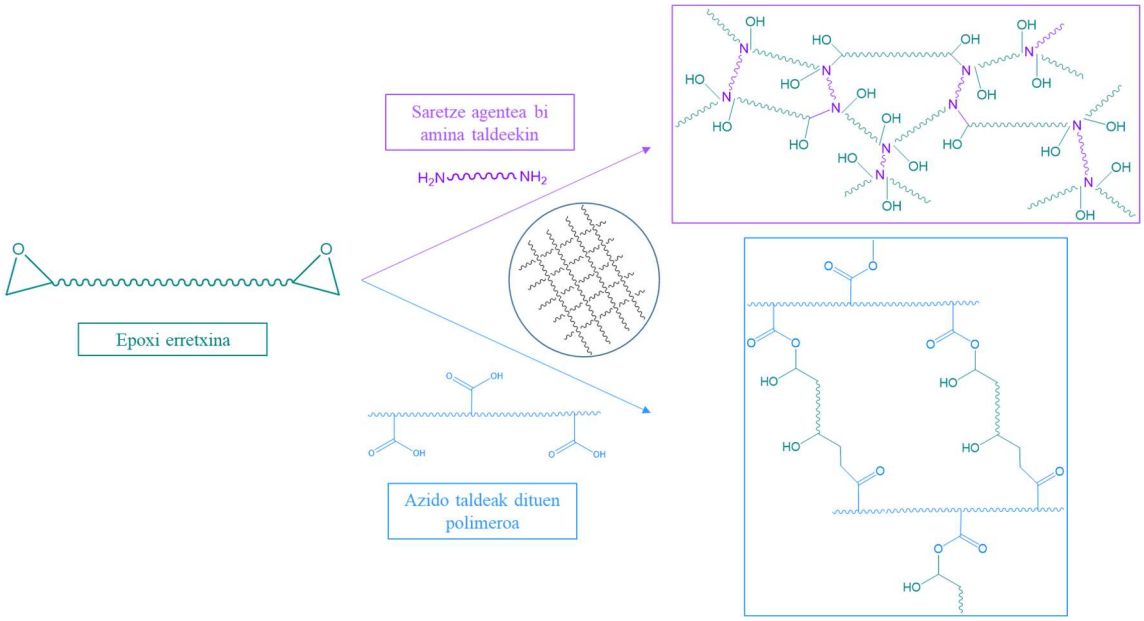
Altzairua munduko sektore askotan (garraioa, tresneria, gailu elektrikoetan etab.) gehien erabiltzen den materialetako bat da, haren trakzio indar altuagatik eta kostu baxuagatik. Dena dela, altzairuak korrosioa jasateko joera dauka eta, daukan garrantzi industriala dela eta, konpainiek babes metodoak garatzea premiazkoa da. Korrosioa oso prozesu azkarra da; metalen gainazala herdoildu eta, kostu ekonomiko eta atzerakuntza teknologikoak ez ezik, ondorio kaltegarriak izan ditzake ingurumen eta pertsonen osasunean (Groysman, 2010; Fragata et al., 2006).

Tradizionalki disolbatzaile organikoetan oinarritutako estaldurak ekoiztu izan dira industrian, uretan oinarritutakoak baina propietate antikorrosibo hobeak izan ohi baitituzte. Hala ere, konposatu organiko hegazkorrak (disolbatzaileak) askatzen dituzte atmosferara. Hauek, usai txarra izateaz gain, kaltegarriak dira ingurumenarentzat eta berotegi-efektua areagotzen laguntzen dute. Azken hamarkadetan, legedi eta ingurumenaren babesaren kontzientzian eman diren aldaketen ondorioz, uretan oinarritutako estaldurak garatzera alderatu da merkatua. Izan ere, uretan oinarritutako estaldurak aukera berdeagoa dira (Galliano, 2002).

Uretan oinarritutako estalduren osagai nagusia latexak dira, beste osagaien artean. Latexak emultsio polimerizazioz sintetizatzen dira, eta uretan barreiatuta dauden tamaina nanometrikoko polimero partikulez osatuta daude. Latexaren ezaugarriek mugatuko dituzte amaieran lortuko den estalduraren ezaugarriak, propietate mekanikoak eta uraren kontrako barrera-gaitasuna besteak beste. Disolbatzaile organikoetan oinarritutako estaldurekin alderatuz daukaten desabantaila nagusia filmaren eraketa prozesuan dago. Ura lurruntzen den bitartean, polimero partikula hauek nahastu eta polimero kateak elkarri korapilatu behar dira film homogeneo bat sortzeko. Horretarako, latexek baldintza zehatz batzuk bete behar dituzte; dena den, prozesua ez da beti perfektua eta sor daitezkeen akatsek estalduraren propietateak kaltetzen dituzte.

Horren ondorioz, gaur egun, automobilgintzan erabiltzen diren estaldura antikorrosiboak disolbatzaile organikoetan oinarritutakoak dira gehienbat, zehazki epoxi/amina sistema batez osatutakoak. Uretan oinarritutako aukerak aztertu dira, polimero estireno/akrilikoko latexak adibidez; dena dela, hauek propietate okerragoak erakusten dituzte. Bisfenol A-n oinarritutako epoxi erretxinek daukaten abantaila nagusia euren estruktura molekularra da (Sørensen et al., 2009). Oso molekula hidrofoboak dira eta, amina edo azido talde batekin erreakzionatuz, sareak sortzeko aukera daukate, urarekiko oso barrera efizienteak sortuz, 1. irudian erakusten den moduan (Tang et al., 2014; Tang et al., 2016). Saretuta dauden polimero partikulekin filmak sortzea ez da prozesu erraza, kateek mugimendu mugatua baitaukate eta, beraz, kohesio txikiko filmak lortzen dira. Epoxi erretxinek saretze prozesua filmaren lehortze prozesuan zehar eman dezakete, film jarraituak lortzeko komenigarriagoa dena.

1. irudia. Epoxi erretxinak saretzeko bi sistema mota.



Saretutako epoxi erretxinek, alde batetik, adhesio bikaina ematen dute metalekin eta urarekiko erresistentzia ona dute; bestetik, zurrunak eta hauskorrak dira eta izpi ultramoreekin degradatu daitezke, kolore horixka bat emanez estaldurei (Sørensen et al., 2009). Epoxiekin konparatuz polimero akrilikoek urarekiko eta, beraz, korrosioarekiko erresistentzia baxuagoa daukate; hala ere, malguagoak dira eta izpi ultramoreekiko erresistenteagoak dira, kolorea eta distira hobeto mantenduz (Tang et al., 2014). Beraz, gure proposamena material bakoitzak dituen ahuleziak orekatzeko, disolbatzaile organikoen erabilera murrizteko eta karbono-aztarna gutxiko estaldura antikorrosiboak lortzeko, epoxi/estireno/akrilikoz osatutako latexak prestatzea da eta, ondoren, euren film eraketa prozesua, morfologia eta propietate antikorrosiboak aztertzea.

2. Arloko egoera eta ikerketaren helburuak

Epoxi erretxina eta polimero estireno/akrilikoak konbinatzeko komertzialki aplikagarriak diren prozesuak aztertu dira eta bi metodo nagusi daude: erretxina ur-dispertsioak eta latexak banatuta prestatu eta nahastea, edo epoxia latexeko polimero partikulen barruan gehituta egotea. Lan honetan lehenengo metodoa erabiltzeko helburuarekin egin diren ikerketak erakutsiko dira.

Epoxi erretxinak estalduretarako saretu ahal izateko, bi modu ezberdin daude. Alde batetik saretze agenteak erabili daitezke, orokorrean bi amina talde edo gehiago dauzkaten molekulak izan ohi direnak. Eta, bestetik, azido taldeak dauzkaten latexeko polimeroak erabili daitezke

(ikusi 1. irudia). Dena den, talde azidodun latexak erabiliz egin diren hainbat ikerketetan arazo bat ikusi da; izan ere, uretan eman daitekeen erretxinaren hidrolisi erreakzio baten ondorioz, konposatu guztiak nahastuta daudenean saretze prozesua uretan dispertsatuta daudela eman daiteke filma sortu aurretik (Zhang et al. 2021). Horrek denbora tarte murriztu bat ematen du estaldura prestatu eta metaletan aplikatzeko.

Lan honen helburua epoxi erretxinaren ur-dispertsioen egonkortasuna eta hidrolisi erreakzioa aztertzea da, amaieran latex akrilikoarekin nahastuz estaldurarako erabiliko den materiala prestatzeko baldintza guztiak zehazteko.

3. Ikerketaren muina

3.1 Atal esperimentala

Lan honetan sonikazioa erabiliz epoxi erretxina bat uretan dispertsatu da eta haren egonkortasuna aztertu da. Horretarako, ondoren azaltzen diren teknikak erabiliz dispertsioa karakterizatu da.

Materialak

Etil azetatoa (Sigma Aldrich), alkil difenil oxido disulfonatoa (Dowfax 2A1, Dow Chemicals), azido klorhidrikoa (HCl, % 37 fumantea, Fluka), azetona deuteratua (azetona d6, Sigma Aldrich) eta deuterio oxidoa (D_2O, Eurisotop) jaso ziren moduan erabili ziren. Ur desionizatua erabili zen dispertsio guztietan. DER 330™ (epoxi erretxina) Oribay-k adeitasunez hornitu zuen.

Sintesia

Epoxi erretxinaren dispertsioa uretan ultrasoinu energia erabiliz sortu zen, sonikazio-makina bat erabiliz (Brandon Sonifier 450), % 80ko anplitudea erabiliz. Lehendabizi, erretxina etil azetatoan disolbatu zen (70/30 epoxi/etil azetato erlazio batean, hurrenez hurren) haren likatasuna txikitu eta dispertsio prozesua errazteko. Ondoren, disoluzio hori ura eta surfaktante nahaste batera gehitu eta, ultrasoinuak erabiliz, erretxina tamaina nanometrikoko tantetan dispertsatu zen sonikazio denbora ezberdinak erabiliz. 1. taulan erabilitako formulazioa erakusten da.

1. taula. Epoxi erretxinaren dispertsioak uretan egiteko erabilitako formulazioa.

Osagaia	Kantitatea (g)
DER 330™	30
Etil azetatoa	12,86
Dowfax 2A1	2,333
Ur destilatua	70

Karakterizazioa

Ur-dispertsioen egonkortasuna Turbiscan-a (Turbiscan Lab® Expert) erabiliz aztertu da, tenperatura eta denbora ezberdinetan zehar zuzenean sonikazio-makinatik atera ondoren.

Erretxina eta etil azetato dispertsioetako tanta tamaina argi-dispertsio dinamiko bidez (*Dynamic Light Scattering, DLS*) neurtu dira sonikatu eta denbora ezberdinetara Malvern Zetasizer ekipoan. Lagin bakoitza hiru aldiz analizatu da.

Epoxi erretxinaren hidrolisia erresonantzia magnetiko nuklearra (EMN) erabiliz aztertu da, Bruker AC 400 eta 500 espektrometro batean. Horretarako, DER 330™ erretxina egoera ezberdinetan aztertu da. Alde batetik, erretxina hidrolizatu gabe aztertu da; bestetik, erretxinaren hidrolisia nahita bultzatu da erretxina hidrolizatuaren erreferentziazko espektro bat izateko.

Erretxinaren hidrolisi prozedura ondorengoa izan da: erretxina azetona d6-an disolbatu eta D_2O gehitu da. Ondoren, HCl % 37-ko disoluziotik tanta bat gehitu zaio eta giro tenperaturan ordubetez utzi ondoren analizatu da. 2. taulan daude adierazita EMN-ak egiteko erabili diren formulazioak.

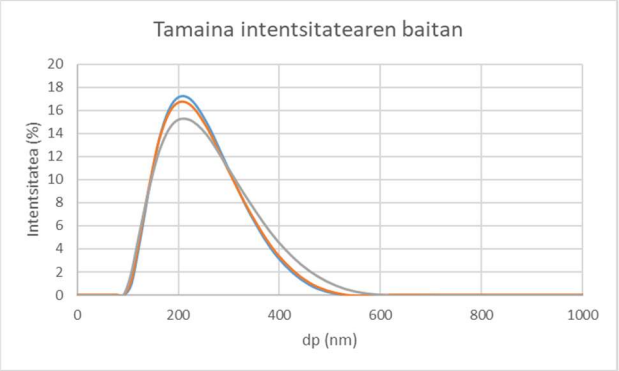
2. taula. EMN analisiak egiteko erabilitako formulazioak

	Osagaia	Kantitatea
Epoxi erretxina azetonan	DER 330™	10 mg
	Azetona d6	350 µL
	D_2O	350 µL
	HCl (%37)	Tanta bat
Epoxi erretxina uretan dispertsatuta	Epoxi/etil azetato dispertsioa uretan	400 µL
	D_2O	50 µL

3.2 Emaitzak eta ondorioak

2. irudian argi-dispertsio dinamiko bidez lortutako epoxi erretxina/etil azetatoaren dispertsioaren tanta tamainen distribuzioa irudikatu da. Horren bidez ikusi daiteke dispertsioko tanten tamaina homogeneoa den ala ez. Epoxiaren pisuarekiko % 3,5 surfaktante erabiliz eta ultrasoinu energia 10 minututan zehar aplikatuz lortu da tanta tamaina distribuzio hau. Batez besteko tanta tamaina 205,4 nm-koa eta polisakabanatze-maila 0,117-koa da. Erabilitako surfaktante kantitatea eta gailuaren anplitudea kontuan izanda, polisakabanatze-maila nahiko zabala da; hori erretxinaren likatasunaren ondorio zuzena dela esan daiteke. Geroz eta likatasun altuagoa, geroz eta energia altuagoa behar da tanta tamaina eta polisakabanatze-maila txikitzeko. Likatasuna are gehiago murriztu liteke etil azetato gehiago gehituz erretxina disolbatzeko; dena den, horrek estaldura lehortzean atmosferara askatuko litzatekeen disolbatzaile organiko kantitatea handituko luke.

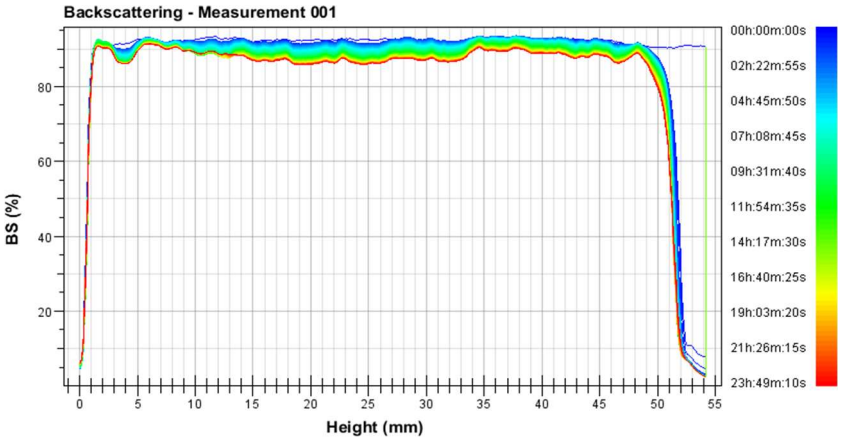
2. irudia. Epoxi/etil azetato dispertsioaren tanta tamainen distribuzioa DLS bidez lortua.



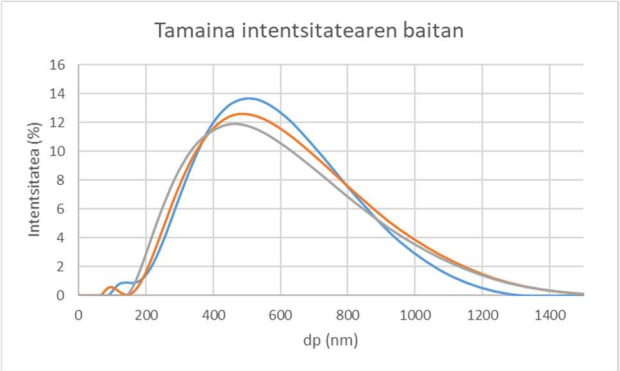
3. irudian Turbiscan-ean lortutako epoxi/etil azetato dispertsioaren erretrodispertsioaren (BS) 24 orduko bilakaera dago irudikatuta. Neurketa honek adierazten du ea lortutako dispertsioa egonkorra den ala ez. Ikusi daiteke denborarekin BS-aren balioa txikitzen doala. 4. irudian, Turbiscan-eko analisia egin ondorengo lagina DLS-an analizatzean lortutako tanta tamainen distribuzioa dago irudikatuta. Bertan ikusi daiteke 24 ordutan dispertsioko tanten tamaina handitu dela, bataz besteko tamaina 428,5 nm eta polisakabanatze-maila 0,174koa

izanda. Horrek azaldu dezake Turbiscanean lortutako BS-a denborarekin aldatzea. Tantak koloidalki egonkorrak ez direnez, tantek euren artean elkartzeko joera dute tanta bakar bat osatuz; horrek dispertsioan dagoen tanta kopurua txikitzen du eta, ondorioz, BS-aren balioa txikitzen da. Analisi hauetatik ondorioztatu daiteke epoxi/etil azetato dispertsioa ez dela egonkorra epe luzera, kontuan hartu beharko dena estaldurak prestatzeko unean.

3. irudia. Turbiscan-eko Epoxi/etil azetato dispertsioaren erretrodispertsioaren bilakaera 24 orduz giro tenperaturan.

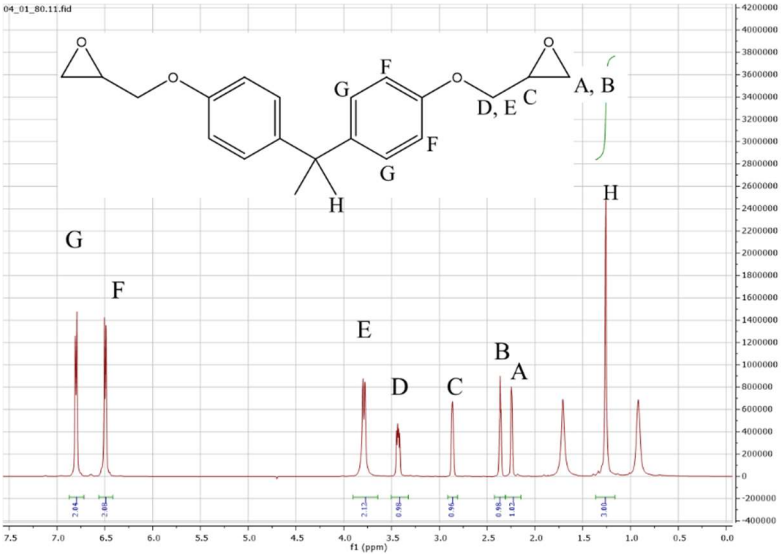


4. irudia. Epoxi/etil azetato dispertsioaren tanta tamainen distribuzioa DLS bidez lortua 24 ordutara.

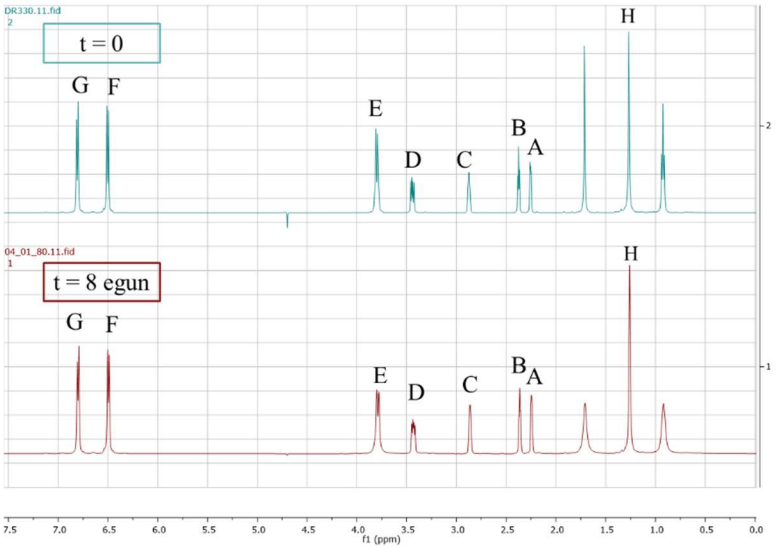


5. irudian EMN bidez lortutako epoxi/etil azetato dispertsioaren protoi espektroa dago irudikatuta. Bertan, erretxinaren estruktura ikusi daiteke dispertsioan. Analisi hori erretxina sonikadorean dispertsatu ondoren egindakoa da. Espektroan ikusi daiteke seinale bakoitzaren azalerak bat egiten duela protoi kopuruarekin, E seinalearenak izan ezik, erretxinaren eta etil azetatoaren bi seinale gainjarrita baitaude. Izendatu gabeko seinaleak etil azetatoari dagozkio. Espektro hau erreferentzia bezala erabili daiteke, erretxinaren hidolisiaren jarraipena egiteko. 6. irudian ikusi daitezke dispertsioaren bi protoi espektro, bat sonikatu ondorengoa eta bestea 8 egunetara egindakoa. Erretxinari dagozkion seinaleak berdin mantentzen direnez, pH neutroan hidrolisirik ez duela jasan ondorioztatu daiteke.

5. irudia. Epoxi/etil azetato dispertsioaren EMN protoi espektroa sonikatu ondoren.



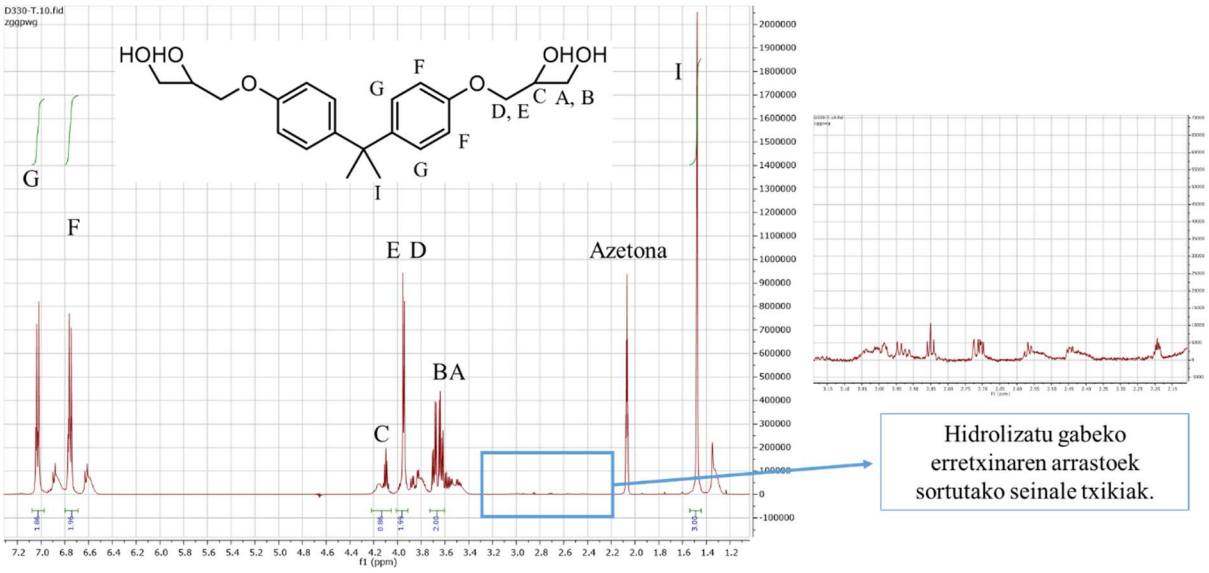
6. irudia. Epoxi/etil azetato dispertsioaren EMN protoi espektroak sonikatu ondoren (urdina) eta 8 egunetara (gorria).



7. irudian hidrolisi erreakzio baten ondorengo protoi espektroa dago irudikatuta, erretxina hidrolizatuaren estrukturarekin. 4. irudiko seinaleekin alderatuz ikusi daiteke desplazatu egin direla hidrolisiaren ondorioz. Erreakzioak pH = 4ko balio batean eta giro tenperaturan ordubete bakarrik behar izan du ia osorik gertatzeko. Kasu honetan HCl-a erabili denez, erretxinaren amaierako estruktura 6. irudikoa da, baina 1. irudiko molekuletako bat izango bagenu (saretzaile diamina bat edo azido taldeak dituen polimero bat), saretutako estruktura batekin amaituko genuke dispertsioan, ondoren estaldura jarraitu bat sortzea zailduko lukeena.

Azken emaitza hau garrantzizkoa da, izan ere, erretxinaren ur-dispertsio hauek pH=2-4-ko balioa duten estireno/akriliko latex-ekin nahasten badira estaldura antikorrosiboak prestatzeko, denbora tarte laburra dago nahastea prestatu eta estaldura egitearen artean. Hortaz, latexen pH-a neutralizatu beharko litzateke nahastea egin baino lehen.

7. irudia. Epoxi erretxina hidrolizatuaren EMN protoi espektroa.



4. Ondorioak

Lan honetan epoxi erretxina eta etil azetatoarekin egindako ur-dispertsioaren egonkortasuna eta erretxinaren hidrolisi erreakzioa aztertu dira. Ikusi da, alde batetik, prestatu diren dispertsioak ez direla guztiz egonkorrak, 24 ordutan tanten tamaina bikoiztu eta polisakabanatze-maila handitzen delako. Horrek komertzialki aplikatzeko aukera deuseztatu arren, laborategi mailan estaldurak erretxina dispertsatu eta zuzenean prestazea kontzeptu-froga gisa nahikoa dela kontsideratu da.

Bestalde, ikusi da erretxinaren hidrolisia ekidin daitekeela ur-dispertsioaren pH-a neutroa den bitartean, eta pH=4-ko balioetan hidrolisia ordubetean ematen dela giro tenperaturan. Lehen aipatu den bezala, ur-dispertsioak pH=2-4ko balioa duten latexekin nahasten badira erretxinaren hidrolisia eragingo luke. Horrek bi aukera uzten ditu, latexak eta erretxinaren ur-dispertsioak nahastu eta zuzenean aplikatzea lagin metalikoan, edo konposatu bat latexetara gehitu (adib. amonio hidroxidoa) haien pH-a neutralizatzeko eta, beraz, aplikaziorako denbora tartea teorikoki handitzeko. Dena dela, saretze agente diaminikoak pH basikoa izan ohi dute, beraz, horiek nahastera gehitzean duten eragina aztertu beharko da.

5. Etorkizunerako planteatzen den norabidea

Egindako lanaren helburua estaldurak egiteko erabiliko den sistema aurretik ezagutzea zen. Emaitza hauek oinarritzat hartuta, ondorengo helburua altzairurako estaldurak prestatzen hastea da. Horretarako, interesgarria izango litzateke, aldez aurretik, erretxina eta saretze agenteen arteko erreakzioaren zinetika eta film eraketa tenperatura ezberdinetan aztertzea. Saretze erreakzioa giro tenperaturan eman badaiteke, horrek estalduren ekoizpenaren kostua txikituko luke.

Bestalde, estaldura antikorrosiboei begira, bi latex ezberdinekin nahastuko dira epoxi ur-dispertsioak: polimero estireno/akriliko bat eta azido taldeak dituen polimero estireno/akriliko bat. Horrez gain, agente saretzaileak erabiltzearen eragina aztertuko da bi kasuetan, bai mota eta bai kantitatea. Guztira lau estaldura mota aztertuko dira, baita haien film eraketa prozesua eta propietate antikorrosiboak ere. Azkenik, agente saretzaileak eta azido taldeak aldi berean izateak amaierako estalduran duen eragina aztertuko da.

6. Erreferentziak

Groysman, A. (2010). Corrosion Phenomena, *Corrosion for Everybody*, 53-108.

Fragata, F., Salai, R.P., Amorim, C., & Almeida, E. (2006). Compatibility and incompatibility in anticorrosive painting. *Progress in Organic Coatings*, 56(4), 257-268. https://doi.org/j.porgcoat.2006.01.012

Galliano, F.; Landolt, D. (2002) Evaluation of corrosion protection properties of additives for waterborne epoxy coatings on steel. *Progress in Organic Coatings*; 44(3): 217-225.

Sørensen, P.A., Kiil, S., Dam-Johansen, K., & Weinell, C.E. (2009). Anticorrosive coatings: a review. *Journal of Coatings Technology and Research*, 6(2), 135-176. https://doi.org/10.1007/s11998-008-9144-2

Tang, E., Bian, F., Klein, A., El-Aasser, M., Liu, S., Yuan, M., & Zhao, D. (2014). Fabrication of an epoxy graft poly(St-acrylate) composite latex and its functional properties as a steel coating. *Progress in Organic Coatings*, 77(11), 1854-1860. https://doi.org/10.1016/j.porgcoat.2014.06.027

Tang, E., Yao, M., Du, P., Yuan, M., & Liu, S. (2016). Synthesis and dynamic mechanical study of core–shell structure epoxy/polyacrylate composite particle. *Journal of Polymer Research*, 23(9), 204-209. https://doi.org/10.1007/s10965-016-1095-1

Zhang, K., Chen, X., Xiao, Y., Liu, R., Liu, J. (2021). Enhanced Anticorrosion Properties through Structured Particle Design of Waterborne Epoxy-Styrene-Acrylate Composite Emulsion. *Coatings,* 11(11), 1422-1440. https://doi.org/10.3390/coatings11111422

7. Eskerrak eta oharrak

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

Tetrafluoroetileno sulfonatuan oinarritutako ionomero komertzialen saretzea protoi-trukatzaileko erregai-pilen mintzen eroankortasuna hobetzeko

Alba Gonda Lazkano, Justine Elgoyhen, Amaia Agirre, Radmila Tomovska
POLYMAT, Kimika Aplikatua Saila, Kimika Fakultatea, Euskal Herriko Unibertsitatea UPV/EHU, Joxe Mari Korta Zentroa, Tolosa Hiribidea 72, 20018 Donostia
alba.gonda@polymat.eu

Laburpena

Nahiz eta tetrafluoroetileno sulfonatatuan oinarritutako ionomeroen erabilera mintz protoi-trukatzaileko erregai-piletan (PEMFC) handia izan, beren potentziala mugatzen duten eragozpen batzuk daude oraindik. Ionomero hauek sortzeko ingurumenean inpaktu negatiboa duten disolbatzaile organikoak erabiltzen dira. Horrez gain, tenperatura altuetan hezetasuna galtzen dutenez, mintzek protoi-eroankortasunean beherakada azkarra jasaten dute. Lan honetan, muga horiek gainditzen saiatu gara, Nafion® tetrafluoroetileno ionomero sulfonatuaren forma saretua sortuz.

Hitz gakoak: PEMFCs, Nafion® , Saretua

Abstract

Despite the wide utilization of the sulfonated tetrafluoroethylene based ionomers in proton exchange membranes for fuel cells (PEMFCs) they still present certain drawbacks. Non-environmentally friendly solvents are used to create the ionomers and the membranes present a rapid decline of the proton conductivity and a loss of performance at high temperatures, because at such conditions they lose the adsorbed humidity. In this work, we have tried to overcome these limitations by creating a cross-linked form of Nafion® sulfonated tetrafluoroethylene ionomer.

Keywords: PEMFCs, Nafion® , cross-linked

1. Sarrera eta motibazioa

Petrolioan oinarritutako energia-baliabideen agortzeari eta klima aldaketari buruzko kezka geroz eta handiagoei erantzuteko mundu osoan erregai fosilen alternatiba garbiak eta eraginkorrak garatzeko premia handia dago. Hidrogenoan oinarritutako teknologiak etorkizuneko agertokirik probableenak direla uste da. Azkenaldian, hidrogeno-teknologia horien artean, erregai-pilak (fuel cells, FC) azkar hazi dira, energia sortzeko aukera eraginkorrak direlako. Erregai-pila mota desberdinak kontuan hartuta, mintz protoi-trukatzaileko erregai-pilak (proton exchange membrane fuel cells, PEMFCs) gaur egungo erabilienak dira. Hala eta ere, PEMFCek komertzializazioa mugatzen duten zenbait eragozpen dituzte oraindik, adibidez, haien funtsezko zati batzuen iraunkortasun motza edo erregai-pilen sistemen kostu altua (Maiyalagan & Pasupathi, 2010; Wang et al., 2011).

PEMFCak polimero-mintz solido batez osatuta daude. Polimero mota hauek ionomero izenarekin ere ezagutzen dira. Gaur egun, gehien erabiltzen diren PEMFCak, azido perfluorosulfoniko (PFSA) motako polimeroetan oinarritzen dira (Walkowiak-Kulikowska et al., 2017). PFSA mintzak oso eroaleak dira eta egonkorrak ingurune azidoetan. Mintz hauen egitura kimikoa hiru eskualde funtzionaletan bana daiteke: poli (tetrafluoroetilenoaren) antzeko kate nagusia, karbono fluoratuan oinarritutako albo-kateak

eta azido sulfonikoko ioiez osatutako ioi multzoak. Mintza heze dagoenenan, azido sulfonikoaren eskualdeko hidrogenoak mugitu egiten dira ur molekulekin edo beste aldeko azido sulfoniko batzuekin lotuz eta mintza eroalea bihurtzen da (Wang et al., 2011). 1960ko hamarkadaren amaieran, DuPont enpresak gaur egun erregai-piletan gehien erabiltzen den mintzetako bat patentatu zuen Nafion® izenarekin (Walkowiak-Kulikowska et al., 2017). Nafion®, merkatuan eskuragarri dagoen azido perfluorosulfonikoko polimero-mintz bat da. PEMFC-etan oso erabilia da protoi-eroankortasun ona, eta indar eta egonkortasun handia duelako, bai ingurune oxidatzaileetan, bai erreduktoreetan. Hala ere, gaur egun Nafion® erregai-pilen merkatuan nagusi den arren, baditu bere aplikazioa mugatzen dituen eragozpen handi batzuk. Adibidez, Nafion®-aren errendimendua ez da ona 0 ºC-tik beherako edota 100 ºC-tik gorako tenperaturetan, hezetasuna galtzen baitu (Ahmad et al., 2022). Nafion® -aren egonkortasuna hobetzeko hainbat estrategia proposatu dira, adibidez, nano-partikula inorganikoak gehitzea, saretzea, tratamendu termikoak eta polimeroen nahasketak (Haragirimana et al., 2020). Estrategia horien artean, Nafion® polimero-kateen saretzea da konponbiderik zuzena eta efektiboena. Gainera, jakina da saretzeak mintzaren propietate mekanikoak eta errendimendua hobetzen dituela tenperatura altuetan, egitura saretuak hezetasuna hobeto gordetzen duelako (Lin et al., 2010).

Lan honetan, Nafion® ionomero komertzialaren mugak gainditzeko, kate luzeera desberdineko diamina saretzaileen bidez ionomero honen egitura saretu da. Espero zen egitura saretua hobetuko zuela mintzak tenperatura altuetan hezetasuna gordetzeko zuen gaitasuna. Are gehiago, egitura saretuak uretan oinarritutako dispertsioen sorrera ahalbidetu zuten, hauek duten egitura disolbaezinari esker. Horrela, ingurumena errespetatzen ez duten disolbatzaileak saihestu dira. Material berriaren karakterizazioarekin batera, mintzaren formazio propietateak, propietate termikoak eta protoi-eroankortasun ere zehaztu dira. Lortutako emaitzek erakutsi dute kate-luzera handiagoko saretzaileak egokiagoak direla kalitate hobeko mintza eratzeko. Gainera, ezaugarri termikoak hobetu eta protoi-eroankortasuna handitu dira. Metodologia sinple hau egungo PEMFCen errendimendua hobetzeko bide potentzial bat izan daiteke.

2. Arloko egoera eta ikerketaren helburuak

Hidrogenoa energia-bektore malgua eta ingurunearekiko errespetuzkoa da. Haren erabilera ez dio berotegi-efektuko gasen isurien murrizketa nabarmenari soilik eragiten, airearen kalitatea hobetzen ere lagundu dezakeena. Aitzitik, energia sortzeko sistema potentziala ere bada garraio-sektorean bereziki. Hidrogenoarekin funtzionatzen duten mintz protoi-trukatzaileko erregai-pilak (PEMFCs) oso erabiliak badira ere, oraindik eragozpen batzuk dituzte. Mintza prestatzeko izaera ez ekologikoko disolbatzaile organiko asko erabiltzen dira, atmosferan konposatu organiko lurrunkorrak askatzen dituztenak. Gainera, tenperatura altuetan mintzek protoi-eroankortasunean beherakada azkarra jasaten dute hezetasuna galtzen dutelako. (Wang et al., 2011)

Ikerketa honen helburua ionomero komertzialen errendimendua hobetzea izan da haien egitura saretuz. Nafion® ionomero komertziala aukeratu da helburu honetarako. Egitura saretuak uretan oinarritutako dispertsio bat sortzea ahalbidetuko du, ingurumena errespetatzen ez duten disolbatzaile organikoak saihestuz, eta mintzen errendimendua hobetuko du tenperatura altuan, elkarri lotutako egiturek mintzaren hezetasuna mantentzen laguntzen baitute. Azkenik, doktorego hau IMMENSE M-ERA.NET Europako proiektuaren parte da eta honen helburu nagusia fabrikazio-teknologia berriekin material-sistema optimizatu batean oinarritutako erregai-pila baten sorkuntza da. Sortutako Nafion® dispertsioak beste herrialdeetako lankideek probatuko dituzte "*Inkyet priniting*"-ean aplikatzeko formulatu eta inprimatuko den tintaren osagai gisa. "*Inkyet priniting*"-a erabiliko da teknologia berria bezala erregai pilaren atal desberdinak elkartzeko.

3. Ikerketaren muina

3.1. Atal esperimentala

Materialak eta karakterizazioan erabilitako gailuak

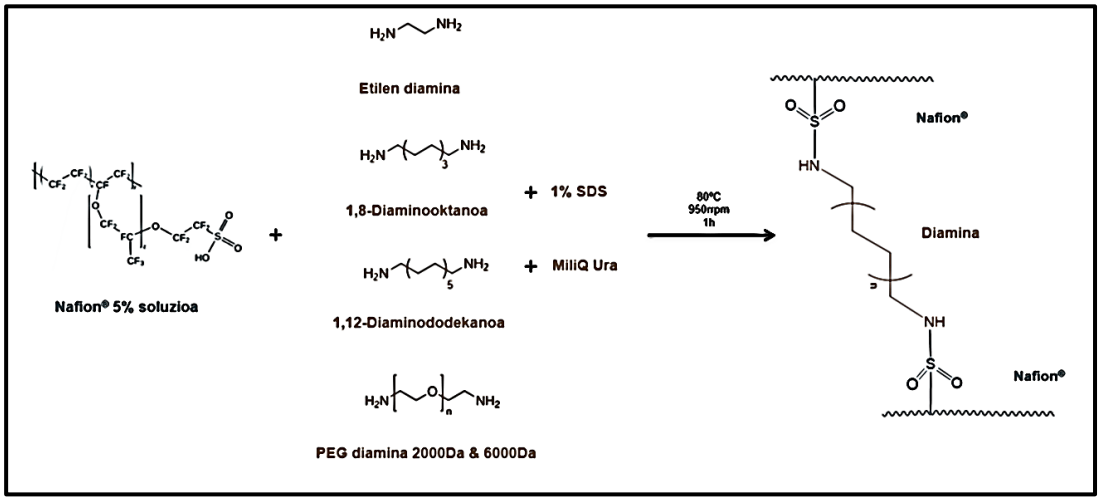
Nafion® % 5 propanol alkoholean eta % 15-20 wt uretan (Sigma Aldrich) duen erretxina perfluoratuzko soluzioa jaso bezala erabili zen. Polietilen glikol (PEG) diamina (Mw=6000Da & 2000Da) (Rapp Polymere), 1,12-diaminododekanoa (Sigma Aldrich), 1,8-diaminooktanoa (Sigma Aldrich) eta etilen diamina (Sigma Aldrich) izan dira erabilitako saretzaileak. Sodio dodezil sulfatoa (SDS, Sigma Aldrich) uretan hidrogela sakabanatzeko eta egonkortzeko erabili da. 1-propanola (Sigma Aldrich) plastifikatzaile gisa erabili da mintzak sortzeko.

Errotabapore gailua (Rotavap, Buchi, R-210) disolbatzaileak kentzeko erabili zen erreakzioaren ondoren. Sonikazioa (Hielscher, Ultrasound Technology) hidrogelak uretan sakabanatzeko erabili zen. Fourier-en transformatu bidezko espektroskopia infragorria (FTIR) Bruker Tensor 27 espektrometro batean monitorizatu zen. Partikulen tamaina Argi-dispertsio dinamikoa, ADD (Malvern Zetasizer Nano ZS) erabiliz zehaztu zen. Transmisiozko mikrokopia elektronikoa, TEM, (Tecnai TM G2 20 200 kV-ra ,FEI Electron Microscopy) partikulen morfologia eta tamaina behatzeko erabili zen. Anton Paar erreometroa erabiliz, Nafion® lagin saretuen dispertsioen biskositateak neurtu ziren. Protoi-eroankortasuna inpedantzia metodoaren bidez aztertu zen zelula itxi batean (galvanostat Autolab 302N). Mintza 8 mm-ko diametroa zuten bi altzairu herdoilgaitz elektrodoen artean jarri zen. Zelda termostatizatutako ganbera batean jarri zen eta protoi-eroankortasuna neurtu zen 95 ºC -tik 25 ºC-ra.

Prozedura esperimentala: Sintesia

Nafion® % 5 kontzentrazioa duen erretxina soluzioari, 1% SDS (Nafionari dagokionez), eta diamina saretzailea gehitu zitzaion masa-ratio desberdinetan, baita MiliQ ura ere, Nafion® kantitate berean. Erreakzioa matraze batean egin zen, etengabe irabiatuz, ordubetez eta 80 ºC-tan. 1. irudian Nafion® komertzialaren saretze-erreakzioa ikusi daiteke. Saretzaile mota (1. Irudia) eta hauen masa-kantitatea aldatu zen mintzaren azken propietateak (mintz-formazioa eta mintz kalitatea, eroankortasuna, propietate termikoak…) nola aldatuko ziren ikusteko.

1. irudia. Nafion® saretzearen erreakzioa diamina saretzaile ezberdinekin.



Erreakzioaren ondoren, rotavap gailua erabili zen urak eta erreaktibo bezala erabilitako Nafion® komertzialak zituen beste disolbatzaile batzuk (n-propanola, 2-propanola) kentzeko, disolbatzailerik gabeko produktua ziurtatzeko. Hidrogel bat lortu zen, gero MiliQ

uretara gehitu zena, eta 30 minutuz sonikatua izan zena uretan sakabanatzeko eta dispertsio bat lortzeko. Dispertsioa material bat partikula moduan (Nafion® saretuaren hidrogela gure kasuan) beste material batean (ura gure kasuan) sakabanatua duen sistema da.

Mintz-formazioa

Lortutako dispertsioak silikona moldeetan gehitu ziren eta lehortu egin ziren estrategia desberdinak erabiliz. Mintzak giro-tenperaturan lehortu ziren (25 ºC), labean 60 ºC-tan 20-24h eta labean 50 ºC-tan hutsean 24h (Ma et al., 2008). Mintz on bat osatzen ez zuten dispertsioei, propanola gehitu zitzaien plastifikatzaile gisa, kantitate desberdinetan (% 0-25), mintz-formazioa hobetu ote zezakeen ikusteko. 2. irudian hobeto ikus daiteke atal esperimentalean eman diren pauso guztiak, baita sintesiaren, hidrogelaren, dispertsioaren eta mintz baten argazkiak.

2. Irudia. Atal esperimentalaren laburpena.

3.2. Emaitzak

Fourier-en transformatu bidezko espektroskopia infragorria, FTIR.

FTIR-ak laginen konposizioa erakusten du, gure kasuan, errotabaporearen urratsaren ondoren hidrogelean propanol disolbatzailerik geratzen zen aztertzeko erabiliz zen. Ikusi zen propanol guztia lurrundu egin zela rotavap gailuarekin. Bestalde, hurrengo esperimentuetan FTIR-a Nafion® -aren saretzea frogatzeko erabiliko da.

Argi-dispertsio dinamikoa, ADD

Helburuen atalean azaldu den bezala, *"Inkyet printing"*-ean osagai gisa Nafion® saretua erabiliko da, beraz, honen dispertsioen partikulen tamaina oso garrantzitsua da. Partikulen tamaina 1000 nm baino txikiagoa izan behar zen, ondoren dispertsioa inprimatu ahal izateko. ADD erabiliz ikusi zen lagin guztiak 1000 nm baina partikula tamaina txikiagoa zutela. Horrez gain, tamainak saretzaile motarekiko eta saretzaile kantitatearekiko

menpekotasunik ez zuela ikusi zen. Ez hori bakarrik, dispertsio guztiak denboran zehar egonkor mantendu zirela ikusi ahal izan zen.

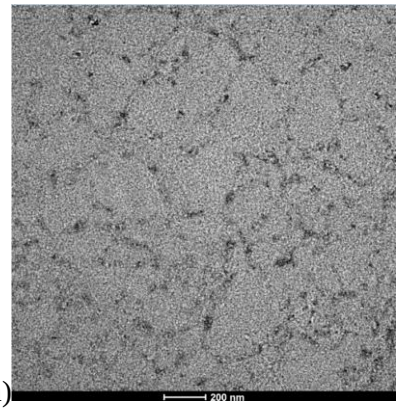
Mintz-formazioa

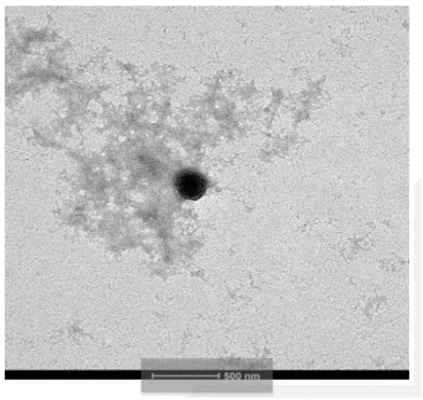
Etilen diamina, 1,8-diaminooktano eta 1,12-diaminododekano saretzaileak erabiliz sortutako dispertsioek ez zuten mintz ona osatu aztertutako baldintzetan (ikusi 3.1 atala , mintz-formazioa). Mintzak erraz puskatzen ziren. Mintzak hobetzeko, propanola plastifikatzaile gisa gehitu zitzaien dispertsioei baina lortutako mintzak ere urratu ziren. PEG diaminak erabili ziren dispertsioetan, giro tenperaturan eta 60 ºC-tan mintz on, sendo eta urradurarik gabe sortu zituzten.

Transmisiozko mikroskopio elektronikoa, TEM

Mikroskopio mota hau laginen partikulen tamaina baieztatzeko eta partikulen egitura ikusteko, erabili zen. Nafion® komertzialak eta 1,8-diaminooktanoarekin saretutako laginak aztertu ziren. Nafion® komertzialean zuntz antzeko partikulak ikusi ziren (3 Irudia (a))(Xue et al., 1989). Saretutako laginean 230 nm-ko partikula batzuk aurki ziren, ADDn aurki ziren tamaina berekoak (3 Irudia (b)). Hala ere, morfologia ezin zen ongi antzeman, lagina prestatu bitartean hidrogelaren deshidratazioa gertatu zelako. Cryo-TEM egingo da partikulen morfologia ikusteko, teknika honek ez baitu lagina aldatzen prestatzen denean.

3. Irudia .(a) Nafion® komertzialaren TEM irudia eta (b) Nafion saretuaren dispertsioaren partikula baten TEM irudia.

(a) 

(b) 

.

Biskositate neurketak

Dispertsioen biskositatea neurtu zen, garrantzitsua baita "*Inkyet printing"* pausoan. Dispertsioen biskositatea baxuegia edo altuegia bada ezin izango baitira zuzenki inprimatu. Beharrezko biskositatea 10-25 cP-koa zen. Saretzaile txikieneko laginek 3cP-ren inguruko biskositateak zituzten. PEG diamina saretzaileko laginek 38-3 cP-ko biskositateak zituzten. Sintesian erabilitako PEG diaminaren kantitatea handiagoa zenean, biskositatea ere handiagoa zen. Biskositateari nabarmen eragiten dio partikula tamainak; izan ere, kontzentrazio berean partikula txikiagoak dituzten dispertsioek partikula kopuru handiagoa dute, ondorioz elkarreragin handiagoa dutenez, biskositate handiagoa dute. Beraz, behar bada, biskositatea kontrola daiteke partikulen tamaina aldatuz.

Protoi-eroankortasuna

Protoi-eroankortasuna kalitate oneko mintzetan bakarrik aztertu zen, PEG diaminarekin sortuak. Mintzak 60 ºC-tan lehortu ziren neurketak baino 24 h lehenago. PEG diaminarekin

saretutako laginen eroankortasunen emaitzak Nafion® komertzialerako lortutakoekin alderatu ziren, eta protoi-eroankortasun askoz handiagoa erakutsi zuten. Gainera, emaitza hau handitu egin zen neurketa-tenperatura handitzearekin batera. Beraz, ikusi zen Nafion® saretuak Nafion® komertzialak 95 ºC-tan baino eroankortasun handiagoa zuela. Litekeena da emaitza hau egitura saretuak eta PEGaren izaera hidrofilikoak hezetasuna mantentzeko duen gaitasunarengatik izatea.

Eroankortasuna handitu egin zen lagineko PEG kantitatea handitu zenean. Hala ere, PEG kantitate handienak dituzten mintzak urtu egin ziren. Horrek erakutsi zuen lagin horien urtze tenperatura baxuegia izan zitekeela erregai-piletan aplikatzeko. Hala ere, konparazioak egiteko erabilitako Nafion® komertzialaren eroankortasun emaitzek literaturan aurki ohi direnak baino askoz txikiagoa izan ziren. Literaturako mintzek protoi-trukerako aurretratamendu azido bat jasotzen dute protoi-eroankortasunaren analisiaren aurretik, eta horrek iradoki zuen gure mintzetan aurretratamendu bat egin behar zela (Haragirimana et al., 2021; Zhu et al., 2022).

4. Ondorioak

Partikulen tamainari dagokionez, ADDak 1000 nm baino tamaina txikiagoko partikulak erakutsi zituen, eta dispertsioak egonkor mantendu ziren denboran zehar. Ondoren, TEM irudiek ADDn ikusitako partikulen tamaina baieztatu zuten. Biskositate neurketek erakutsi zuten PEG laginen biskositateak behar ziren balioen inguruan zeudela. Gainera, biskositatea partikulen tamaina aldatuz kontrola liteke behar bada. Beraz, partikulen tamainari eta biskositatearen emaitzei dagokienez, dispertsio batzuek "*Inkyet prinitng"*-ean aplikatzeko zuzenak ziren. Mintz-formazio esperimentuek erakutsi zuten saretzaile luzeagoak erabiltzen zirenean mintz-formazioa hobea dela. PEG diamina saretzaileak mintzik onenak erakutsi zituzten. Are gehiago, mintz-formazioa hobea zen giro-tenperaturan. Eroankortasun probak egin ziren mintz horietan, eta horietako batzuek Nafion® komertziala baino eroankortasun handiagoa erakutsi zuten tenperatura altuenetan. Hala ere, neurketak errepikatu egin behar dira, arlo honetako artikulu zientifikoetan erakusten diren protoi-trukerako aurretratamendurik ez zelako egin. Sintesian, PEG kantitate desberdineko laginak prestatu ziren ikusteko nolako eragina izango zuen emaitzetan. Ikusi zen PEG gehiago zuten laginek eroankortasun handiagoa erakusten zutela. Hala ere, PEG kantitate handienak zituzten laginek ez ziren erregai piletarako egokiak tenperatura altuetan urtzen zirelako. Horregatik, Nafion® eta PEG diaminaren arteko masa-proportzio egokia aukeratu behar da, protoi-eroankortasun handia eta propietate termiko onak mantentzen dituena. Azkenik, PEG diamina 6000Da-rekin Nafion® saretutako lagin batek baldintza guztiak betetzen zituela egiaztatu zen. Lagin honek 533 nm (< 1000 nm) partikulako tamaina erakusten zuen, giro tenperaturan eta 60 ºC-tan mintz formazio ona eta Nafion® komertziala baino eroankortasun handiagoa 35 ºC-tik 95 ºC-ra, urtu gabe. Saretzeak ahalbidetu du uretan oinarritutako formulazioak sortzen ingurunearentzat txarrak diren disolbatzaileak saihesten. Gainera, ikusi da tenperatura altuetan mintzak eroankortasun hobea duela hidratatuta kontserbatzeko gai delako. Beraz ikusi da, saretzeak metodologia sinplea dela eta gaur egun erabiltzen diren mintzen hainbat muga gainditu ditzaketela.

5. Etorkizunerako planteatzen den norabidea

Hurrengo esperimentuetan, memoria honetan zehar azaldu diren laginen karakterizazioak amaituko dira. Are gehiago, Aquivion ® albo-kate-laburra duen ionomero komertziala saretuko da eta Nafion ® -aren modu berean aztertuko da. Emaitzak konparatuko dira albo-katearen luzerak duen eragina aztertzeko.

6. Erreferentziak

Ahmad, S., Nawaz, T., Ali, A., Orhan, M. F., Samreen, A., & Kannan, A. M. (2022). An overview of proton exchange membranes for fuel cells: Materials and manufacturing. *International Journal of Hydrogen Energy*, *47*(44), 19086–19131. https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2022.04.099

Haragirimana, A., Ingabire, P. B., Liu, Y., Li, N., Hu, Z., & Chen, S. (2020). An effective strategy to enhance the performance of the proton exchange membranes based on sulfonated poly(ether ether ketone)s. *International Journal of Hydrogen Energy*, *45*(16), 10017–10029. https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2020.01.180

Haragirimana, A., Li, N., Hu, Z., & Chen, S. (2021). A facile, effective thermal crosslinking to balance stability and proton conduction for proton exchange membranes based on blend sulfonated poly(ether ether ketone)/sulfonated poly(arylene ether sulfone). *International Journal of Hydrogen Energy*, *46*(29), 15866–15877. https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2021.02.022

Lin, H., Zhao, C., & Na, H. (2010). Nafion-assisted cross-linking of sulfonated poly(arylene ether ketone) bearing carboxylic acid groups and their composite membranes for fuel cells. *Journal of Power Sources*, *195*(11), 3380–3385. https://doi.org/10.1016/j.jpowsour.2009.12.044

Ma, C. C. M., Hsiao, Y. H., Lin, Y. F., Yen, C. Y., Liao, S. H., Weng, C. C., Yen, M. Y., Hsiao, M. C., & Weng, F. B. (2008). Effects and properties of various molecular weights of poly(propylene oxide) oligomers/Nafion® acid-base blend membranes for direct methanol fuel cells. *Journal of Power Sources*, *185*(2), 846–852. https://doi.org/10.1016/j.jpowsour.2008.06.089

Maiyalagan, T., & Pasupathi, S. (2010). Components for PEM fuel cells: An overview. In *Materials Science Forum* (Vol. 657, Issue October). https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/MSF.657.143

Walkowiak-Kulikowska, J., Wolska, J., & Koroniak, H. (2017). Polymers application in proton exchange membranes for fuel cells (PEMFCs). *Physical Sciences Reviews*, *2*(8), 1–34. https://doi.org/10.1515/psr-2017-0018

Wang, Y., Chen, K. S., Mishler, J., Cho, S. C., & Adroher, X. C. (2011). A review of polymer electrolyte membrane fuel cells: Technology, applications, and needs on fundamental research. *Applied Energy*, *88*(4), 981–1007. https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2010.09.030

Xue, T., Trent, J. S., & Osseo-Asare, K. (1989). Characterization of nafion® membranes by transmission electron microscopy. *Journal of Membrane Science*, *45*(3), 261–271. https://doi.org/10.1016/S0376-7388(00)80518-9

Zhu, L., Li, Y., Zhao, J., Liu, J., Wang, L., Lei, J., & Xue, R. (2022). Enhanced proton conductivity of Nafion membrane induced by incorporation of MOF-anchored 3D microspheres: A superior and promising membrane for fuel cell applications. *Chemical Communications*, *58*(17), 2906–2909. https://doi.org/10.1039/d2cc00160h

7. Eskerrak eta oharrak

Eskerrak POLYMAT institutuari eta IMMENSE M-ERA.NET (EU proiektua, No 958174) proiektuan parte hartzen duten unibertsitate, ikerketa zentro eta enpresei proiektua aurrera eramaten laguntzeagatik.

Kolesterol-kanporaketaren estimulazioa ateroma ereduan, rHDLen administrazio sekuentzialarekin

Shifa Jebari Benslaiman[1,2], Kepa Belloso Uribe[1], Asier Benito Vicente[1], Unai Galicia García[1], Asier Larrea Sebal[1,2], Ane San José Urteaga[1,2], Iraide Alloza[1,3], Koen Vandenbroeck[1,3], Cesar Martín[1,2]

1 Biokimika eta Biologia Molekularra Saila, EHU, 48940 Leioa
2 Biofisika Institutua (CSIC-EHU), 48940 Leioa2
3 Biocruces Bizkaia Health Research Institute, 48903 Barakaldo

shifa.jebari@ehu.eus

Laburpena

Aterosklerosia arterien gune azpi-endotelialean gertatzen den kolesterol metaketaren ondorioz garatzen da, gaixotasun kardiobaskular larriak eragin ditzakeelarik. Aterosklerosiaren tratamendurako, HDL naturalak (dentsitate handiko lipoproteinak) imitatzen duten hainbat nanopartikulen diseinua burutu izan da (rHDL), ateroma plakako soberazko kolesterola iraizteko helburuarekin. rHDLek kolesterola jasotzeaz gain mikroRNAk edo antagomiRNAk (mikroRNA inhibitzaileak) bezalako molekulak garraiatu ditzakete. Ikerketa honetan, rHDL administrazio sekuentziala ateroma eredu batean ezarri zen. Lehen administrazioan, ABCA1 kolesterol garraiatzailearen adierazpena emendatzeko antagomiRNA bat garraiatu zen rHDL bidez eta bigarrenean, rHDLak soberazko kolesterola jasotzeko gehitu ziren.

Hitz gakoak: aterosklerosia, kolesterola, rHDL, mikroRNA garraioa

Abstract

Atherosclerosis develops as a result of the accumulation of cholesterol in the subendothelial space of the arteries, which can cause serious cardiovascular diseases. For the treatment of atherosclerosis, the design of several nanoparticles (rHDL) that mimic natural HDLs has been carried out for the purpose of removing excess cholesterol in ateroma plaques. In addition to cholesterol uptake, rHDLs can transport small molecules such as microRNAs, or their inhibitors, antagomiRNAs. In this study, the sequential administration of rHDL was implemented in an atheroma model. In a first administration, an antagomiRNA was transported by rHDLs to increase the expression of ABCA1 cholesterol transporter, and in a second administration, rHDLs were added to remove cholesterol from the cells.

Keywords: atherosclerosis, cholesterol, rHDL, microRNA delivery.

1. Sarrera eta motibazioa

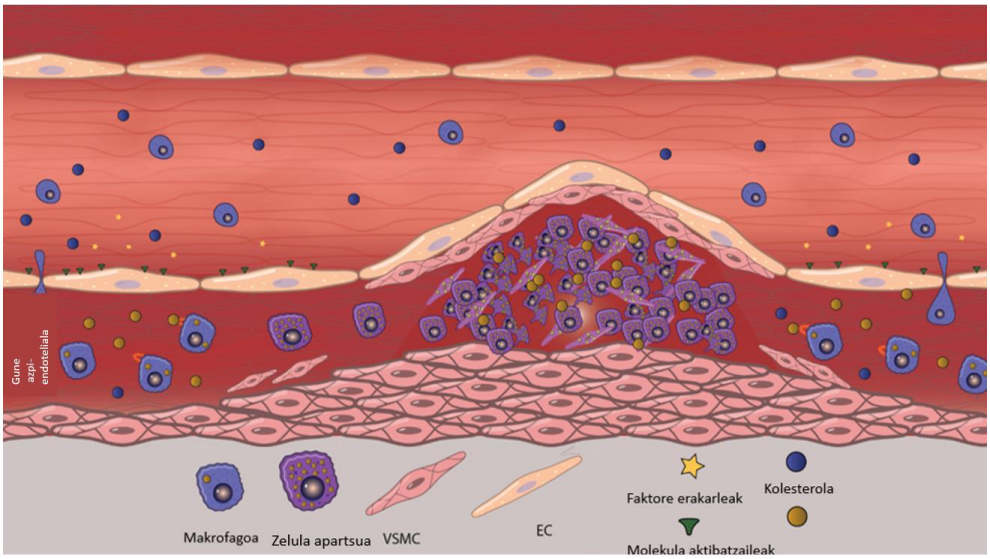
Aterosklerosia lipido eta hantura zelulen pilaketaz nabarmentzen den gaixotasuna da eta gaur egun, gaixotasun kardiobaskularren eragile nagusia da (Tabas et al., 2007). Aterosklerosiaren garapen prozesuaren hasieran arteriak barrutik estaltzen duen endotelio zelula-geruza (EC) “aktibatzen” da, kolesterolaren pilaketaren ondorioz (Liao, 2013). Prozesu honek hantura zelulen migrazioa bultzatzen du, endotelio geruzapean. Gune azpi-endotelial horretan, kolesterol eta makrofagoen metaketarekin batera, hantura bidezidorrak aktibatuko dira (Sheedy et al., 2013). Aterosklerosiaren garapena prozesu oso konplexua izanik, lan honetan gaixotasunaren funtsezko faseak baino azalduko dira.

Gune azpi-endotelialera migratutako zelulen artean makrofagoak daude, pilatutako gehiegizko kolesterola barneratuko dutenak, gorputzaren zelula garbitzaileak baitira. Zelula hauek barneratutako kolesterola lipido tantetan metatuko dute eta zelula apartsuetan bihurtuko dira (Bobryshev, 2006).

Ondoren, arteriaren pareta osatzen duten muskulu leuneko zelulak (VSMC) gune azpi-endotelial horretara migratuko dira. Zelulen migrazio mota hau ez da normalean gertatzen, baina, hantura egoeran, faktore ezberdinak isurtzen dira, alboko zeluletan ez-ohiko efektuak estimulatzen direlarik (Allahverdian et al., 2014).

Hala VSMCak endotelio geruzaren azpian kokatzen dira eta zelulaz kanpoko matrizea jariatzen dute geruza haritsu bat eratuz. Honekin, gune azpi-endotelialaren edukia babestu egiten da, odolera jariatu ez dadin. Egitura horri ateroma plaka esaten zaio eta tamainaz handitzen doanez, gertaera kardiobaskularren (garuneko infartua, bihotzekoa, besteak beste) probabilitatea emendatzen da (1. irudia).

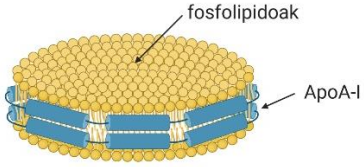
1. irudia: Ateroma plakaren garapenaren laburpen eskematikoa: kolesterola gune azpi-endotelialean filtratuko da. Endotelioa aktibatu eta makrofagoen migrazioa bultzatuko du gune azpi-endotelialera. Bertan, makrofagoek kolesterola barneratuko dute zelula apartsuetan bihurtuz. Jariatutako faktore erakarleen ondorioz, VSMCak migratu eta endotelioaren azpian kokatuko dira. Horren ondorioz, ateroma plaka handituko da, odol fluxua oztopatuz.



Gorputzak baditu ateroma plakaren garapena geldiarazteko edo behintzat murrizteko prozesuak. Horien artean HDL partikulak (dentsitate handiko lipoproteinak) burutzen duten prozesua dago. HDLak ateroma plakaren gehiegizko kolesterola hartu eta bertatik ateratzeko gai diren partikula naturalak dira (kolesterol ona izenez ezagunagoak dira) (Adorni et al., 2007). Horretarako odolean zirkulatzen duten HDLak arterien endotelio geruza zeharkatu eta gune azpi-endotelialeko zelulekin interakzionatzeko gai dira.

Hala, HDLak zelula apartsuekin interakzionatu eta bertatik kolesterola hartzen dute. Zehazki, HDLak osatzen duten apoA1 proteinak makrofagoen ABCA1 kolesterol garraiatzailearekin interakzionatzen du (Frambach et al., 2020) eta kolesterola HDL partikulara pasatzen da. HDL helduak, kolesterolaz beteta, odolera bueltatu eta gibelera zuzentzen dira (2. Irudia). Gibelean kolesterola jariatzen dute bertan deuseztatzeko. Izan ere, gibela da kolesterolaren sintesiaz eta deuseztapenaz arduratzen den gorputzeko organo nagusia (Frambach et al., 2020).

2. irudia: HDL naturalen egitura. HDak, apoA1 izeneko proteinaz eta fosfolipidoez eratuta daude. Hasiera batean disko itxura aurkezten dute; baina, kolesterola ehunetatik jasotzen duten heinean partikulak tamainaz handitzen doaz, esferak bihurtuz. Azkenean HDL helduak gibelera zuzenduko dira, kolesterola entregatzeko.



2. Arloko egoera eta ikerketaren helburuak

2.1. rHDLak, HDL nanopartikula sintetikoak

80. Hamarkadan, HDL eta makrofagoen artean ematen den interakzioa itu terapeutiko moduan erabiltzea hurbilpen baliotsua izan zitekeela proposatu zen, aterosklerosia prebenitzeko edota tratatzeko. Horrek, HDL naturalak imitatzen duten nanopartikulen sorrera bultzatu zuen, rHDL moduan ezagutzen direnak (ingelesetik, *reconstituted HDL*). Partikula horiek giza apoA1 proteinaz eta lipido desberdinez osatuta daude. Horiek ehun periferikoetatik odolera kolesterola azkar mobilizatzeko gai dira (Badimon et al., 1990; Shaw et al., 2008).

Gainera, rHDLak hainbat molekula garraiatzeko baliagarriak dira, besteak beste, farmakoak eta bestelako agente terapeutikoak. Horien artea DNA eta RNA molekula txikien erabilpena dago, nanopartikulen zati lipidikoarekin lotzen direnak (Kim et al., 2007; Michell & Vickers, 2016). Horien artean mikroRNAk (RNA molekula txikiak) daude. Zelula batean mikroRNAek proteinen adierazpen maila erregulatzen dute, zehazki itu proteinen adierazpen maila murriztuz (Alles et al., 2019). Beraz, proteina baten adierazpena murriztu nahi bada, intereseko mikroRNAren kantitatea handiko beharko litzateke, mikroRNA hura nanoapartikuletan garraiatuz. Aldiz, proteina baten adierazpena emendatu nahi bada, zelulen mikroRNA endogenoa inhibituko duen molekula osagarria garraiatu beharko litzateke, antagomiRNA moduan ezagutzen dena.

2.2. Helburua

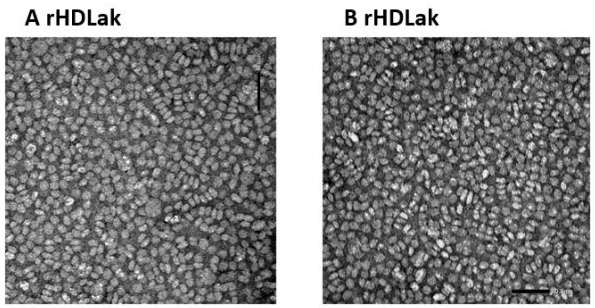
Testuinguru horretan, bi pausoko estrategia terapeutiko bat garatu dugu ateroma plakatik kolesterolaren kanporaketa hobetzeko asmoz. rHDL lehen administrazioan, antagomiRNA-33 (mikroRNA-33aren inhibitzailea) zeramaten rHDLak erabili ziren, konposizio jakin bat zutenak. antagomiRNA horren azken helburua zelula apartsuen ABCA1 garraiatzailearen adierazpena emendatzea zen, mikroRNA-33 endogenoa inhibituz. Bigarren pausoan, konposizio desberdina zuen beste rHDLak erabili ziren, kasu honetan kolesterola zelula apartsuetatik jasotzeko helburuarekin. Sinplifikatzeko, lehen konposiziodun rHDLei A rHDLak esango diegu eta bigarrenei B rHDLak.

Gainera, estrategia terapeutiko hau ateroma eredu batean ezarri zen. Normalean, *in vitro* egiten diren esperimentuak plastikozko plaka batean ereindako zelula geruza batean egiten dira. Kasu honetan baina ateroma plaka imitatzen duen eredu bat erabili zen, *in vivo* prozesuaren antzekoagoa izan zedin.

3. Ikerketaren muina

3.1. rHDLen sorrera: rHDLak protokolo sinple baten bidez garatu ziren (Jebari-Benslaiman et al., 2020), lipido eta apoA1 proteina erabiliz. Horrekin, disko itxurako partikula nanometrikoak lortu ziren. Nanopartikula hauek sortu, purifikatu eta hainbat teknika biofisikoen bitartez aztertu ziren, sintesia egokia zela baieztatzeko. Teknika horien artean, transmisiozko mikroskopio elektronikoa da teknika bisualena, nanopartikulen argazkiak ateratzen baititu (3.irudia).

3. irudia: Transmisiozko mikroskopia elektronikoko irudi erakusgarriak. Ezkerrean A konposiziodun rHDLak daude, antagomiRNAk garraiatzeko erabili zirenak eta eskumaldean B rHDLak, zelula apartsuetatik kolesterola jasotzeko erabili zirenak. Itxura berdina izan arren, rHDL horiek lipido konposizio ezberdinez osatuta daude, funtzio ezberdinetarako erabiltzea ahalbidetzen duena.



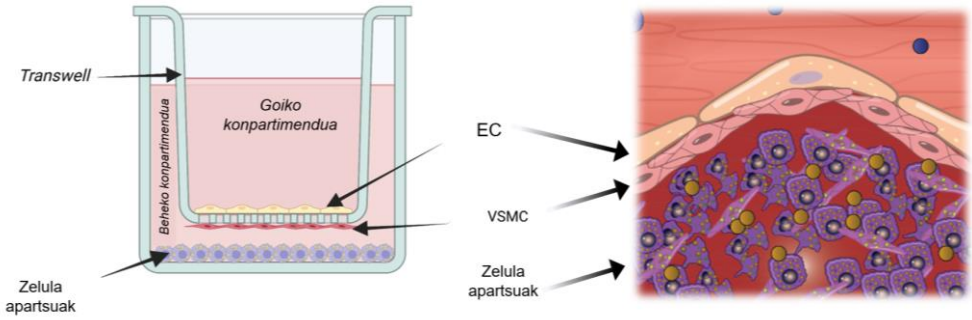
3.2. Ateroma ereduaren garapena

Garatutako ateroma eredua *in vivo* gertatzen den prozesuarekiko antzekotasun handiagoa du, ateroma plakaren egitura eta konplexutasunari dagokionez. Eredu hau bi dimentsio eta hiru lerro zelularrez osatuta dago.

Zer dela eta bi dimentsio? Ateroma eredua garatzeko *Transwell* izeneko mintzak erabili ziren zeinak kultibo plaka normal batean sartzen diren (4. irudia). *Transwell* horiek 2 lerro zelular ezberdin ereiteko aukera eskaintzen du, bata azpialdean eta bestea goialdean. Gure kasuan, goialdean giza endotelio zelulak (EC) erein ziren eta azpian muskulu leuneko zelulak (VSMC).

Zer dela eta hiru lerro zelular? Kultibo plaken putzuetan zelula apartsuak erein ziren. Hala, *Transwell* mintzak plaka putzuekin konbinatzean 3 lerro zelularreko eredu bat lortzen dugu. Lerro zelular horien kokapena dela eta, aterosklerosiaren fase aurreratua imitatzea lortzen dugu. Sarreran esan bezala, fase horretan arteriako paretaren muskulu leuneko zelulak migratu eta endotelioren azpian kokatzen dira, gure modeloan bezala (4. irudia).

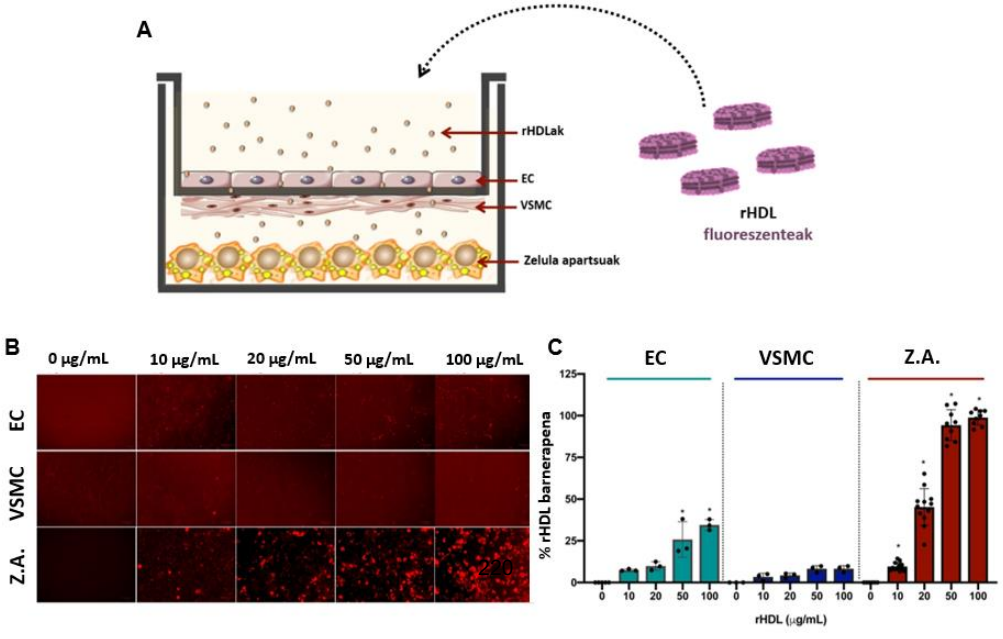
4. irudia: Aterosklerosiaren fase aurreratua imitatzen duen ateroma eredua. Ateroma eredua hiru lerro zelularrez osatuta dago: zelula apartsuak plakaren hondoan, eta ECak eta VSMCak bi dimentsiotako geruza bat eratuz *Transwell* mintzaren alde bietan. Ereduko zelulek, ateroma plakan duten kokapena berdina dute.



3.3. rHDLak ateroma eredua zeharkatzeko eta zelula apartsuetan barneratzeko gai dira.

rHDLak ateroma eredua zeharkatzeko gai direla aztertzeko, fluoreszentzia bidez markatu eta ateroma ereduaren gainaldean gehitu eta 48 orduz inkubatu ziren (5A. irudia). Horren ostean, *Transwell* mintza kendu, bertatik VSMC eta EC zelulak desitsatsi eta rHDLen barnerapena aztertu zen 3 lerro zelularretan. Horretarako, zelulen barneko fluoreszentzia seinalea neurtu zen, fluoreszentziazko mikroskopioa eta fluxu zitometria bidez.

5. irudia: rHDLen barnerapenaren neurketa ateroma ereduaren zeluletan. rHDLak fluoreszenteki markatu ziren eta horiek ateroma ereduaren goiko konpartimenduan inkubatu ziren (A). Horren ostean, zelula mota bakoitzean rHDLen barnerapena aztertu zen bai fluoreszentziazko mikroskopioaz (B), bai fluxu zitometria bidez (C). Z.A.: zelula apartsuak.



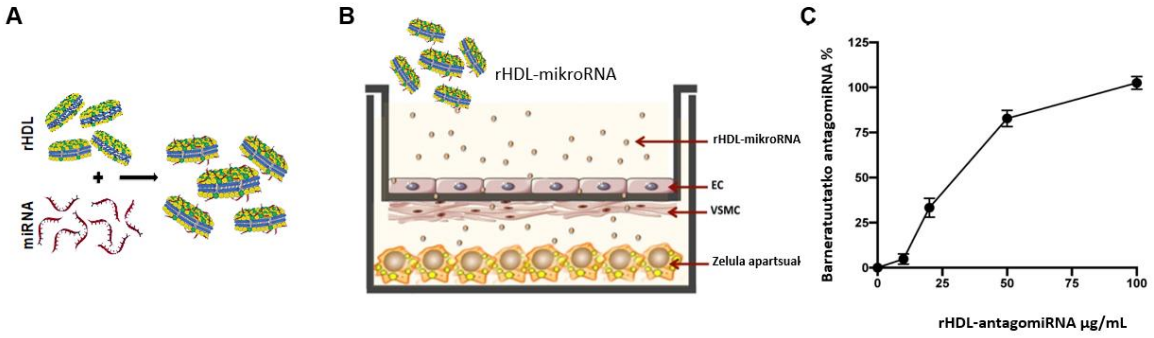
5B irudian lerro zelular bakoitzaren mikroskopio irudiak agertzen dira. rHDLak tanta gorri moduan agertzen dira eta irudietan ikusi daitekenez, zenbat eta rHDL gehiago gehitu, orduan eta seinale handiagoa dago zeluletan. 5C grafikoan, fluxu zitometria bidez barneratutako rHDLen kantitate erlatiboa neurtu zen. Bi tekniken bidez lortutako emaitzak ikusita, rHDL kantitate handiena zelula apartsuetan barneratu zela esan daiteke, gure itu nagusian alegia.

3.4. antagomiRNAren rHDL bidezko garraioaren azterketa

antagomiRNAk rHDLekin inkubatu egin ziren ordu batez. Interakzio elektrostatikoak direla eta, antagomiRNAak nanopartikulen alde lipidikoari itsasten dira (6A. irudia). Kasu honetarako, B konposiziodun rHDLak erabili ziren. Ondoren, ateroma modeloaren goiko konpartimentuan gehitu eta 48 orduz inkubatu ziren (6B irudia).

rHDLei lotutako antagomiRNAk zelula apartsuetan barneratzen zirela aztertzeko antagomiRNAk zuzenean neurtu ziren, qRT-PCR moduan ezagutzen den teknika kuantitatiboa erabiliz (ingelesetik, *quantitative real time PCR*). 6C. irudian ikusten denez, zelula apartsuetan antagomiRNAk barneratu ziren eta gainera antagomiRNAren barneraketa rHDLen barneraketarekiko zuzenki proportzionala zen (6C eta 5C irudiak alderatuz).

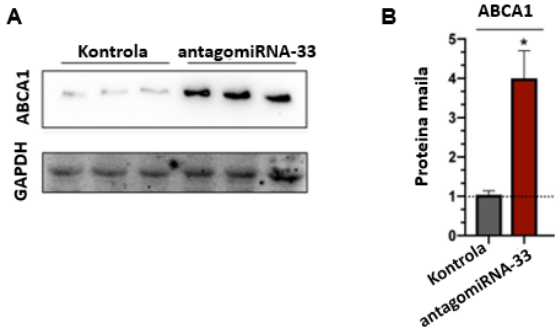
6. irudia. A. B konposiziodun rHDLak antagomiRNArekin inkubatu ziren lotzeko. B. Jarraian, rHDL-antagomiRNA sistema ateroma ereduaren goiko konpartimenduan gehitu ziren. C. Inkubatu ostean antagomiRNAren barnerapena zelula apartsuetan neurtu zen qRT-PCR bidez.



3.5. rHDL bidezko antagomiRNA garraioa intereseko efektua du

rHDL bidezko antagomiRNAen garraioa ateroma ereduan funtzionatzen zuela behin egiaztatzean, garraio sistema honen efektua aztertu zen. Zehazki, antagomiRNAk ABCA1 kolesterol garraiatzailearen adierazpen mailan eraginik zuen aztertu zen. Horretarako, ABCA1en kantitatea neurtu zen, western plapaketa deituriko teknika bidez. Western plapaketa proteinak detektatzeko eta euren kantitatea neurtzeko teknika konparatibo bat da. Eta, kontrol negatiboarekin alderatuz (rHDL hutsak), rHDL-antagomiRNAkin inkubatutako zelulek ABCA1 garraiatzailearen adierazpen handiagoa zuten (7. irudia). Hau da, antagomiRNAk zelula apartsuetan barneratzeaz gain, efektiboak ziren.

7. irudia: rHDL bidez garraiatutako antagomiRNAk zelula apartsuetan efektua dute. antagomiRNAk zelula apartsuetan barneratzeaz gain, ABCA1 kolesterol garraiatzailearen adierazpena emendatzeko gai zen. A. Handipen hori western plapaketa bidez neurtu zen. B. Lortutako irudiaren neurketa.

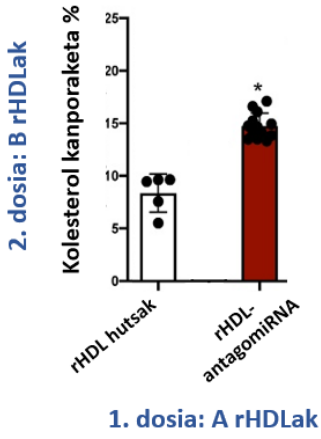


3.6. Kolesterol kanporaketaren azterketa ateroma ereduan

Amaitzeko, ABCA1en adierazpenaren handipena, kolesterol kanporaketaren handipenarekiko proportzionala zela demostratu behar zen. Izan ere, kolesterolaren kanporaketa estimulatzea zen lan honen helburu nagusia. Horretarako, behin ateroma ereduan rHDL-antagomiRNA inkubatzean, eta ABCA1 garraiatzailearen adierazpena emendatzean, bigarren administrazioa gehitu zitzaion.

Bigarren administrazio horretarako, B konposiziodun rHDLak erabili ziren. Kasu honetan, rHDLak zelula apartsuetatik kolesterola jasotzeko erabili ziren. Beraz, lehen dosian rHDL-antagomiRNA konbinazioa gehitu zen, eta 48 ordu ostean, B rHDLak gehitu ziren, zelula apartsuetatik kolesterola jasotzeko. 8. irudian kolesterol kanporaketaren emaitza agertzen da. Kolesterol kanporaketa handiagoa zela ikusi daiteke, lehen administrazioan rHDL-antagomiRNAk gehitu zirenean.

8. irudia: kolesterol kanporaketaren neurketa. Lehen administrazioan rHDL hutsak erabiltzean (antagomiRNA barikoak) eta bigarren administrazioan rHDLak gehitzean, % 7,5eko kolesterol kanporaketa lortu zen, ateroma ereduaren zelula apartsuetan. Bestalde, lehen administrazioan antagomiRNAk lotuta zituzten rHDLak gehitzean, bigarren administrazioan rHDLak gehitzean kolesterol kanporaketa bikoiztea lortu zen.



4. Ondorioak

Aterosklerosiaren fase aurreratua imitatzen duen ateroma eredua garatu zen hiru lerro zelular nagusiak bateratzen dituenak, endotelio geruza, azpian kokatzen den muskulu leuneko zelulen geruza, eta horien azpian dauden zelula apartsuak.

HDL naturalak imitatzen duten nanopartikulak garatu ziren, rHDLak. Horiek HDLak bi zentzuetan imitatzen dituzte, alde batetik kolesterola hartzeko gaitasunean eta bestean, antagomiRNAk (edo mikroRNAk orokorrean) garraiatzeko gaitasunean.

Lan honetan rHDLen administrazio sekuentzialak kolesterol kanporaketa estimulatzen duela demostratu zen ateroma ereduaren zelula apartsuetan. Hala, lehen dosian rHDLak antagomiRNA-33 garraiatzeko erabili ziren, zelula apartsuetan ABCA1 kolesterol garraiatzaileren adierazpena emendatzeko. Jarraian, bigarren dosian, rHDLak zelula apartsuetatik kolesterola jasotzeko erabili ziren.

Beraz, rHDLen administrazio sekuentziala estrategia terapeutiko interesgarria izan daiteke, aterosklerosia duten pazienteen ateroma plaka murrizteko edota saihesteko helburuarekin.

5. Etorkizunerako planteatzen den norabidea

Behin estrategia terapeutikoa ateroma ereduan ezarri zela, hurrengo pausoa *in vivo* aztertzea izango litzateke. Zehazki, aterosklerosi animali eredu batean estrategia terapeutikoa frogatu beharko litzateke. Honekin, bizidun konplexu batean rHDLek duten portaera aztertzea ahalbidetzen da, tratamenduaren farmakozinetika eta farmakodinamika zehazteaz gain.

6. Erreferentziak

Adorni, M. P., Zimetti, F., Billheimer, J. T., Wang, N., Rader, D. J., Phillips, M. C., & Rothblat, G. H. (2007). The roles of different pathways in the release of cholesterol from macrophages. *Journal of Lipid Research*, *48*(11), Art. 11. https://doi.org/10.1194/jlr.M700274-JLR200

Allahverdian, S., Chehroudi, A. C., McManus, B. M., Abraham, T., & Francis, G. A. (2014). Contribution of Intimal Smooth Muscle Cells to Cholesterol Accumulation and Macrophage-Like Cells in Human Atherosclerosis. *Circulation*, *129*(15), Art. 15. https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.113.005015

Alles, J., Fehlmann, T., Fischer, U., Backes, C., Galata, V., Minet, M., Hart, M., Abu-Halima, M., Grässer, F. A., Lenhof, H.-P., Keller, A., & Meese, E. (2019). An estimate of the total number of true human miRNAs. *Nucleic Acids Research*, *47*(7), Art. 7. https://doi.org/10.1093/nar/gkz097

Badimon, J. J., Badimon, L., & Fuster, V. (1990). Regression of atherosclerotic lesions by high density lipoprotein plasma fraction in the cholesterol-fed rabbit. *Journal of Clinical Investigation*, *85*(4), Art. 4. https://doi.org/10.1172/JCI114558

Bobryshev, Y. V. (2006). Monocyte recruitment and foam cell formation in atherosclerosis. *Micron (Oxford, England: 1993)*, *37*(3), Art. 3. https://doi.org/10.1016/j.micron.2005.10.007

Frambach, S. J. C. M., de Haas, R., Smeitink, J. A. M., Rongen, G. A., Russel, F. G. M., & Schirris, T. J. J. (2020). Brothers in Arms: ABCA1- and ABCG1-Mediated Cholesterol Efflux as Promising Targets in Cardiovascular Disease Treatment. *Pharmacological Reviews*, *72*(1), Art. 1. https://doi.org/10.1124/pr.119.017897

Jebari-Benslaiman, S., Uribe, K. B., Benito-Vicente, A., Galicia-Garcia, U., Larrea-Sebal, A., Alloza, I., Vandenbroeck, K., Ostolaza, H., & Martín, C. (2020). Cholesterol Efflux Efficiency of Reconstituted HDL Is Affected by Nanoparticle Lipid Composition. *Biomedicines*, *8*(10), Art. 10. https://doi.org/10.3390/biomedicines8100373

Kim, S. I., Shin, D., Choi, T. H., Lee, J. C., Cheon, G.-J., Kim, K.-Y., Park, M., & Kim, M. (2007). Systemic and Specific Delivery of Small Interfering RNAs to the Liver Mediated by Apolipoprotein A-I. *Molecular Therapy*, *15*(6), 1145-1152. https://doi.org/10.1038/sj.mt.6300168

Liao, J. K. (2013). Linking endothelial dysfunction with endothelial cell activation. *The Journal of Clinical Investigation*, *123*(2), Art. 2. https://doi.org/10.1172/JCI66843

Michell, D. L., & Vickers, K. C. (2016). Lipoprotein carriers of microRNAs. *Biochimica Et Biophysica Acta*, *1861*(12 Pt B), Art. 12 Pt B. https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2016.01.011

Shaw, J. A., Bobik, A., Murphy, A., Kanellakis, P., Blombery, P., Mukhamedova, N., Woollard, K., Lyon, S., Sviridov, D., & Dart, A. M. (2008). Infusion of Reconstituted High-Density Lipoprotein Leads to Acute Changes in Human Atherosclerotic Plaque. *Circulation Research*, *103*(10), 1084-1091. https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.108.182063

Sheedy, F. J., Grebe, A., Rayner, K. J., Kalantari, P., Ramkhelawon, B., Carpenter, S. B., Becker, C. E., Ediriweera, H. N., Mullick, A. E., Golenbock, D. T., Stuart, L. M., Latz, E., Fitzgerald, K. A., & Moore, K. J. (2013). CD36 coordinates NLRP3 inflammasome activation by facilitating intracellular nucleation of soluble ligands into particulate ligands in sterile inflammation. *Nature Immunology*, *14*(8), Art. 8. https://doi.org/10.1038/ni.2639

Tabas, I., Williams, K. J., & Borén, J. (2007). Subendothelial Lipoprotein Retention as the Initiating Process in Atherosclerosis: Update and Therapeutic Implications. *Circulation*, *116*(16), 1832-1844. https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.106.676890

7. Eskerrak eta oharrak

Esker onak SGIker zerbitzuari (EHUko Biomedikuntza Zerbitzuko Mikroskopia Analitikoa eta Erresoluzio Handiko Mikroskopia).
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.

Ardiaren 21 ehunetan karakterizatutako eta kuantifikatutako miRNA molekulen adierazpenaren banaketaren azterketa

[1,2]Martin Bilbao-Arribas, [1]Aitor Guisasola-Serrano, [1]Endika Varela-Martínez, [1]Laura Diez-Fuentes, [1]Begoña Marina Jugo

[1]Genetika, Antropologia Fisikoa eta Animalien Fisiologia Saila, Zientzia eta Teknologia Fakultatea, Euskal Herriko Unibertsitatea UPV/EHU

[2]Terapia Genikoa eta Gene-Adierazpenaren Erregulazioa Programa, CIMA Nafarroako Unibertsitatea, IdiSNA

aguisasola013@ikasle.ehu.eus, begonamarina.jugo@ehu.eus

Laburpena

MikroRNA molekulak (miRNA) eboluzioan zehar kontserbatuta dauden eta gene-adierazpena erregulatzen duten RNA ez-kodetzaile txikiak dira. Ardian, beste etxe-abereekin konparatuta, miRNA gutxi deskribatu dira. Lan honetan, datu-baseetan argitaratuta dauden ardiaren 21 ehunetako 172 miRNA-seq lagin era uniformean analizatu ditugu, miRNA berrien eta kontserbatuen adierazpen profilak aztertzeko. Aztertutakoen artean, 270 miRNA molekulek ehun espezifikotasun indizearen balio altuak azaldu zituzten. Gainera, hausnarkarien espezifikoa den mir-2284/mir-2285 miRNA familiako 100 miRNA inguru detektatu ziren. Lan honek miRNA askoren kontserbazio maila altuaren ideiarekin bat dator, baina aldi berean hausnarkarien eboluzioan klado-espezifikoak diren berrikuntzen potentziala azpimarratu du.

Hitz gakoak: miRNA, miRNA-seq, adierazpena, hausnarkariak, ehun espezifikoa

Abstract

MicroRNAs (miRNAs) are evolutionarily conserved small non-coding RNAs that regulate gene expression. In sheep, few miRNAs have been described compared with other livestock species. We uniformly analyzed 172 public ovine miRNA-seq datasets from 21 different tissues in order to predict conserved and novel miRNA precursors and profile their expression patterns. 270 miRNAs showed high tissue specificity index values. Strikingly, over 100 precursors from the ruminant-specific family of mir-2284/mir-2285 miRNAs were found. This work supports the known high evolutionary conservation of many miRNAs, but also highlights the potential of clade-specific innovations in ruminant evolution.

Keywords: miRNA, miRNA-seq, expression, ruminant, tissue-specific

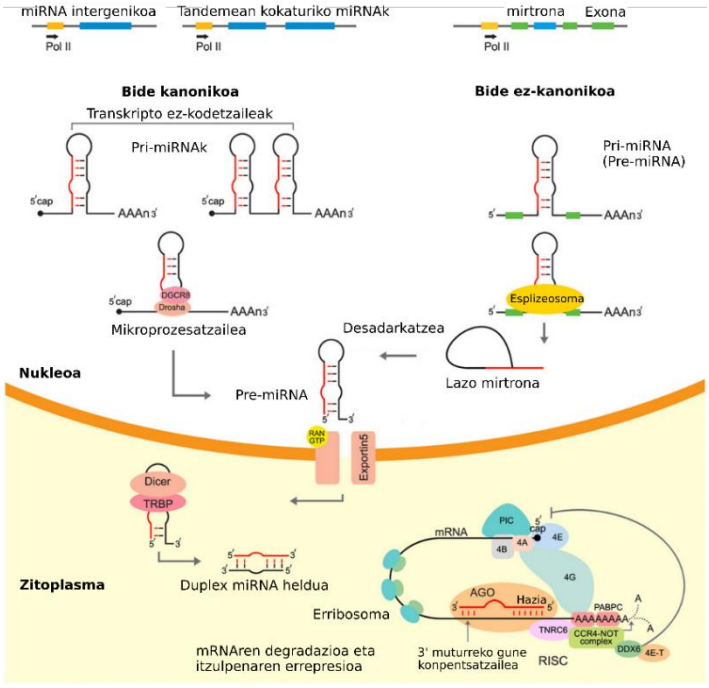
1. Sarrera eta motibazioa

MikroRNAk (miRNAk) eboluzioan zehar kontserbatuta dauden 22 base-pare inguruko RNA ez-kodetzaile txikiak dira eta geneen adierazpena erregulatzea dute helburu (Bartel, 2018). Lehen miRNA, Lin-4 izenekoa, 1993. urtean aurkitu zen *Caenorhabditis elegans* nematodoan eta, garai batez, salbuespen gisa kontsideratu zen (Hammond, 2015). Gaur egun, ezagun da miRNAk landare eta animalien erregulazioan eginkizun garrantzitsu bat dutela eta proteinen adierazpenaren herena erregulatzen dutela estimatu da (Bartel, 2004).

MiRNA molekulek genoman kokapen ugari izan ditzakete, intronen barruan (mirtronak) edo exon ez-kodetzaileetan (miRNA intergenikoa), adibidez. MiRNA molekulen portzentaje txiki bat jarraian kokatuta dago (Saliminejad et al., 2018). MiRNA intergenikoak ez dira beste geneetatik gertu agertzen, beraz, promotore propioa duten transkripzio unitateak dira (Bartel, 2004). II RNA polimerasak (Pol II) miRNAen portzentaje handi bat transkribatzen du. Lehen irudian ikus daiteken bezala, bide kanonikoan transkribatzen den lehen egiturari pri-miRNA deritzo (Bartel, 2018). Drosha eta DGCR8 izeneko azpiunitateak dituen mikroprozesatzaile izeneko konplexu batek pri-miRNA mozten du, gutxi gora behera 70 nukleotido dituen eta pre-miRNA deritzon begizta formako RNA molekula bat sortzen da (García-Lopez et al., 2013). Kanonikoak ez diren bide alternatiboetan bide kanonikoko zenbait urrats egin gabe pre-miRNA edo miRNA helduak sortzen dira. Mirtronak, adibidez, Drosha eta DGCR8 gabe

sortzen dira. Horien ordez esplizeosomak pri-miRNAk prozesatzen ditu eta lazo mirtrona izeneko begizta formako egitura bat eratzen da. Egitura hau desadarkatzean pre-miRNA sortzen da (Westholm et al., 2011).

1. irudia: jarraian kokaturiko miRNAen, miRNA intergenikoaren eta mirtronen biogenesiaren diagrama. Zelula nukleo barruan eta zitoplasman gertatzen diren prozesuak bereizten dira (Saliminejad et al.-etik moldatua, 2018).



Pre-miRNA nukleotik zitoplasmara garraiatzen da eta bertan prozesaketa-konplexu batek pre-miRNA mozten du begiztaren alboan. Mozketa honek 22 base-pare (bp) inguruko kate bikoitzeko miRNA heldua (duplex miRNA heldua) sortzen du (Bushati et al., 2007). Duplex miRNA helduaren harizpietako bat argonauta proteina (AGO) batekin lotu eta honek RISC deritzon konplexu erribonukleoproteiko baten eraketa induzitzen du. Azken konplexu horrek eragiten du transkripzio osteko isilpena (Saliminejad et al., 2018). RISC konplexuak bi mekanismo erabil ditzake mRNA isiltzeko: itu mRNAren degradazioa edo itzulpenaren errepresioa. MiRNA eta mRNAren arteko osagarritasunak bi mekanismoetatik zein gertatzen den determinatzen du (Pillai, 2005).

Beraien ugaritasuna eta aniztasuna dela eta, miRNA molekulen ikerketa gero eta garrantzi gehiago hartzen ari da. Izan ere, gero eta diagnostiko molekular gehiago egiteko erabiltzen ari dira miRNAk eta gaixotasun askorekin erlazionatu dira. Minbiziaren kasuan, adibidez, miRNA onkogeniko (OncomiR) ugari detektatu dira, minbizi baten garapena eragin edo areagotu dezaketenak, baina tumore supresore bezala parte hartzen duten miRNAak ere detektatu dira. Kasu batzuetan miRNA berberak oncomiR edo tumore supresore bezala jadun dezaketela ikusi da (Svoronos et al., 2016). Minbiziaz gain, miRNAk diabetesean, gaixotasun kardiobaskularretan eta patogeno birikoetan markatzaile molekular bezala erabil daitezke, eta molekula terapeutiko moduan erabiltzeko garapen prozesuan daude zenbait gaixotasunentzako (Saliminejad et al., 2018).

2. Arloko egoera eta ikerketaren helburuak

Gure ikerketa-taldean RNA ez-kodetzaileak identifikatu, karakterizatu eta aztertzen ditugu eta etxe-abereak, batez ere ardiak, erabiltzen ditugu eredu biologiko bezala. Dagoeneko ardiaren entzefaloan, odol-zelula mononuklearretan (PBMC) eta birikietan adierazten diren miRNAk, RNA ez-kodetzaile luzeak (lncRNAk) eta RNA zirkularrak (circRNAk) aztertu ditugu RNA-seq teknikaren bidez (Varela-Martínez et al., 2018; Bilbao-Arribas et al., 2019; Varela-Martínez et al., 2020). Ikerketa horiek txertoen eta patogenoen aurkako erantzun immunearen testuinguruan burutu dira.

Beste etxe-abereekin konparatuta, ardian miRNA molekulei buruzko informazio eta anotazio falta handiagoa ikus daiteke. Gizakian 2000 miRNA baino gehiago ezagutzen dira eta ahuntza, behia, zaldia eta txerria bezalako espezieetan ehunka miRNA daude deskribatuta miRBase datu basean, ardian ordea soilik 106 pre-miRNA (Kozomara et al., 2019). Ardiaren ehun ugari miRNA-seq teknikaren bidez, tamaina txikiko RNA molekulen sekuentziazio teknika, aztertu diren arren, ez dira hainbat ehun era integratuan aztertu. Honelako ikerketak garrantzitsuak dira miRNA ehun espezifikoak identifikatzeko eta ehun ugaritan zehar miRNA molekuleen adierazpenaren ikuspegi orokor bat izateko. Jadanik egin dira honelako ikerketak beste espezie batzuetan, adibidez gizakian (Ludwig et al., 2016), behian (Sun et al., 2019) edo zaldian (Pacholewska et al., 2016). MiRNA-seq datuek aukera bikaina eskaintzen dute datu base publikoetan gordeta dauden datuak bildu eta era integratuan ikertzeko. Modu honetan, ikerketa bakar batetarako bildutako laginek soilik erantzun ezin dituzten galdera zientifikoak erantzun daitezke (Sielemann et al., 2020).

Aurrekari hauek kontuan hartuta, lan honetan ardiaren ehun ugaritan eginiko miRNA-seq datuak bildu dira eta, ardiaren erreferentziazko genoma eguneratuena erabiliz, tresna bioinformatikoekin landu eta estatistikoki aztertu dira, era konparagarri eta uniformean. Lan honetan lortu nahi diren helburuak ondokoak dira: alde batetik, miRNAen azterketa deskriptiboa eta ebolutiboa egitea, eta bestetik ardiaren ehun bakoitzean miRNA ehun espezifikorik dagoen determinatzea, identifikatzea eta beste espezie batean ere identifikatu den ikustea.

3. Ikerketaren muina

3.1 Laginen bilketa eta miRNAen karakterizazioa

PubMed-eko “sheep” eta “miRNA-seq” hitzekin agertzen ziren ikerketa-lanak errebisatu ostean, ardiaren ehunetan miRNA-seq egiten duten eta sekuentziatutako laginak SRA, ENA edo GEO datu baseetara igo dituzten 20 lan aurkitu ziren (1. taula). Animali hauetan ugalketak daukan garrantzi komertzialagatik, hautatutako 20 lanetatik 5 ardiaren ugal aparatuari buruzkoak ziren (endometrioa, obulutegia eta gorputz luteoa) eta beste lan batean (Salavati et al., 2020) azterturiko ehunen artean ugal aparatuko beste bi lagin agertzen ziren (obiduktua). Bareako lau lagin gehiago lortu ziren, gure lan taldeak aztertu zituenak eta datu baseetan igota ez zeudenak. Guztira 21 ehunetan banaturiko 172 lagin lortu ziren.

Irakurketen kalitate kontrola eta adaptadoreen ezabatzea Trimmomatic programarekin egin zen. Datuen aurreprozesaketa egin baino lehen, laginek batez beste 15,37 ± 0,53 milioi irakurketa zituzten eta ostean 14,07 ± 0,5 milioi. MiRNAk ardiaren genomaren aurka mapeatu ziren miRDeep2 programarekin eta honek laginetako sekuentzien batezbesteko % 82,85 ± 0.8 mapeatu zuen ardiaren genomaren aurka. 1047 sekuentzia hautatu ziren benetako miRNA izateko 0.83 ± 0.01 eko probabilitatea zutenak miRDeep2 tresnaren arabera.

Adierazpen maila kuantifikatzeko orduan, miRNA berrien artean kopia anitzezko sekuentziak zeudenez, CD-HIT tresna erabili zen miRNA berrien pre-miRNAen sekuentziak 0,9ko identitatearen arabera batzeko. 1014 kluster lortu eta kuantifikatu ziren. Pre-miRNA bakoitzak bi miRNA heldu sor dezakeenez, kuantifikazio ostean 1985 miRNA heldu lortu ziren. Gutxienez ehun batean 10 irakurketa ez zituzten miRNAk kendu ostean 1082 miRNA heldu mantendu ziren. Modu esangarrian adierazten ziren miRNA horietatik 935 (% 86,4) anotatu gabeko miRNA berriak ziren ardian eta 147 (% 13,6) ardian ezagunak. MiRNA berrien artean 574 miRNA kontserbatuta agertu ziren gizakian, txerrian, ahuntzan, behian edo zaldian eta beste 361 ez ziren espezie horietan aurkitu.

1. taula. Lan honetarako hautatutako ikerketen BioProject zenbakiak, horiek azterturiko ehunak, ehun bakoitzeko lagin kopurua parentesien artean eta hautatutako ikerketen artikuluak (izatekotan).

BioProject zenbakia	Ehunak eta lagin kopurua
PRJNA451237	Obulutegia (6), Endometrioa (2)
PRJNA354833	Ehun adipotsua (2)
PRJEB22101	Obulutegia (10)
PRJEB32852	Gorputz luteoa (10)
PRJEB32852	Endometrioa (10)
PRJNA392421	Hesteak (3)
PRJEB20781[a]	Nodulu linfatikoa (6)
PRJNA505702	Obulutegia (6)
PRJNA474913	Birikiak (5)
PRJNA532808	Garuna (12)
PRJNA511987	Bihotza (6), Muskuloa (6), Birikiak (6), Giltzurrunak (4), Gibela (5), Barea (6)
PRJNA414087[b]	Behazun xixkua (2), Bihotza (2), Azala (2), Muskuloa (2), Nodulo linfatikoa (2), Kolona (2), Omasoa (2), Errumena (2), Obiduktua (2), Ureterra (2)
PRJNA454385	PBMC (6)
PRJNA528259	Garuna (5)
	Barea (4)
PRJNA638028	Obulutegia (3)
PRJNA613135	Barrabila (8)
PRJNA608075	Bularreko guruina (6)
PRJNA694531	Epipidimoa (9)
PRJNA607580	Bularreko guruina (6)

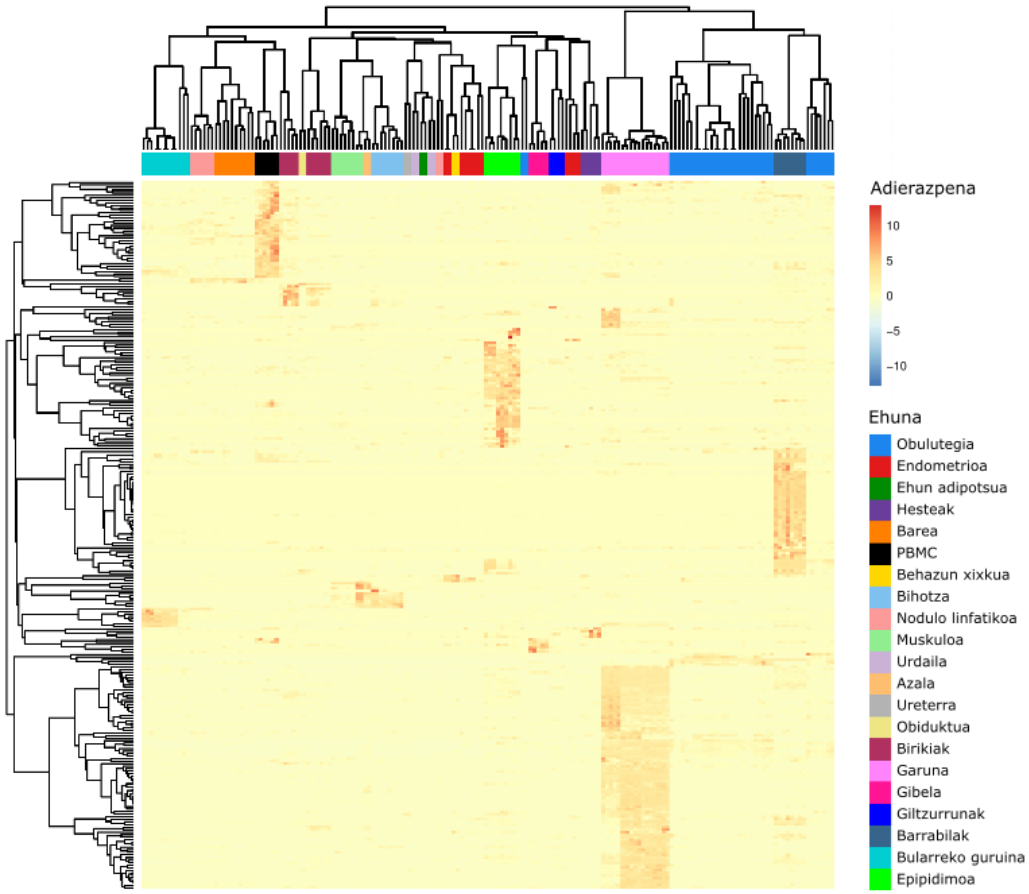
[a] Egilearen baimenarekin [b] The Ovine FAANG Project

3.2 MiRNA ehun espezifikoak

MiRNA molekulen ehun espezifikotasuna aztertzeko Yanai eta bere lan taldeak garatutako tau (τ) ehun espezifikotasun indizea (EEI) erabili zen (Yanai et al., 2004). 0,9 baino EEI balio altuagoa zuten 270 miRNA ehun espezifiko bezala kontsideratu ziren. Garuna da miRNA ehun espezifiko gehien zituen ehuna eta jarraian PBMCak. Ile sustraiak eta behazun xixkuak bazituzten ere miRNA ehun espezifiko gutxi batzuk (2. irudia).

Lan honetan identifikaturiko zenbait miRNA ehun espezifiko beste espezie batzuetan ere ehun berdinetan miRNA ehun espezifiko bezala identifikatu izan dira. Gizakian, adibidez, hurrengo miRNAk identifikatu ziren ardiaren ehun beretan: miR-9, miR-7 eta miR-219a garunean; miR-133a muskuloan eta miR-215 hestean (Ludwig et al., 2016). Panda handiaren, zaldiaren, gizakiaren eta ardiaren gibelean mir-122-5p miRNA agertu zen miRNA ehun espezifiko bezala. MiRNA hau glukosa eta lipidoen metabolismoan parte hartzen duela ikusi da (Ludwig et al., 2016; Sun et al., 2019; Wang et al., 2020; Pacholewska et al., 2016). Lan honetan identifikaturiko ardiaren beste miRNA ehun espezifiko bat mir-138 izan da, ardiaren garunean adierazten dena. Arratoian MiR-138 garunean ere adierazten da, eta loaren erregulazioan parte hartzen duela egiaztatu da (Davis et al., 2012).

2. irudia. Ehun espezifikotasun indizea 0.9 baino altuagoa duten 270 miRNA molekulen adierazpen Heat Map-a, laginak korrelazio bidez taldekatzen direlarik. MiRNA molekulen adierazpena log10-gatik transformaturiko milioiko irakurketetan (CPM) adierazita dago.



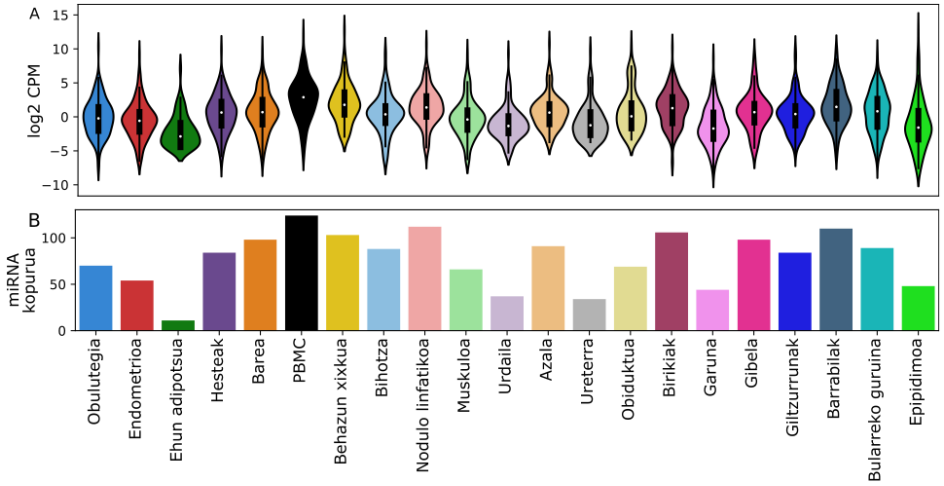
3.3 Hausnarkari espezifikoa den mir-2284/mir-2285 familia

Mir-2284/mir-2285 familiak azterketa sakonagoa behar du. Familia honen kideak behian detektatu ziren lehen aldiz, baina beste hausnarkari batzuen genoma aztertu ahala hausnarkarien espezifikoa dela baieztatu da, ardian, ahuntzan eta zebuan ere detektatu baita.

Lan honetan mir-2284/mir-2285 familiako miRNAen prekurtsoreak adierazten dituzten 146 loci detektatu dira. Filtroak pasa eta gero, 156 miRNA helduek guk ezarritako adierazpen minimoa gainditu zuten. Orokorrean, familia honetako miRNAek jadanik mirBasen anotatutako miRNAk baino adierazpen txikiagoa erakusten dute. Ordea, lan honetan aurkitutako miRNA berri eta ez-kontserbatuek baino adierazpen handiagoa dute. Zenbait ehunetan, familia honetako miRNAen adierazpena altuagoa da beste ehun batzuekin konparatuta, sistema inmunearekin loturiko Odol periferikoko zelula nukleatuetan (PBMCetan) edo nodulu linfatikoetan kasu (3. irudia). Barrabiletan mir-2284/mir-2285 familiaren adierazpena altuagoa da ere. Barean, ordea ez da adierazpen altuago hau antzematen.

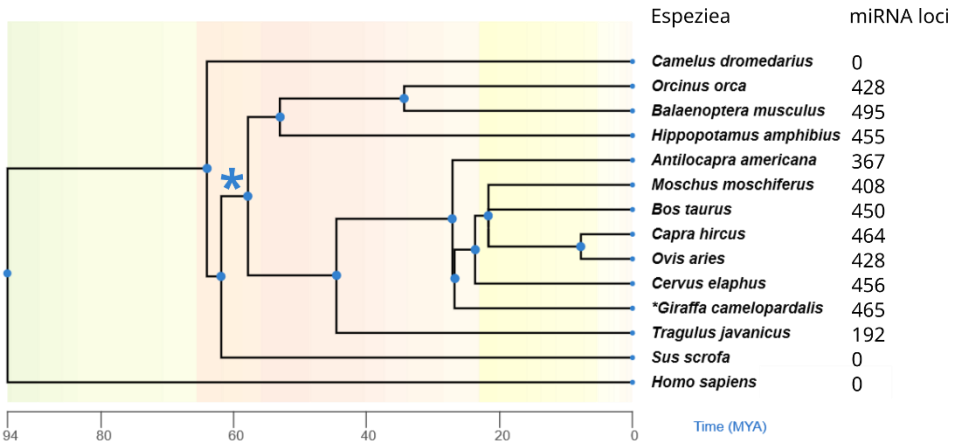
Mir-2284/mir-2285 familiako miRNAen sekuentziak tresna bioinformatikoekin aztertuz, zein geneetan eragiten duten aurresan daiteke. TargetScan tresnarekin egindako analisiek AP3S1 genea familia honetako 34 miRNA desberdinen itu-genea dela iradoki zuten, aurresandako geneen artean miRNA gehiagoren itua izanik. AP3S1 geneak adierazten duen azpiunitate espezifikoak intsulinaren hartzailearen seinalizazioan paper garrantzitsu bat duela ikusi da (VanRenterghem et al., 1998). Osotara, 98 gene identifikatu ziren mir-2284/mir-2285 familiaren itu bezala. Gene Ontology datu baseko prozesu biologikoak aztertu ziren 98 gene horietan eta ikusi zen hormonen erregulazioarekin, emeen sexu organoen erregulazioarekin eta kanpo estimuluen erantzunarekin harremanduta zeudela. Prozesu biologiko estatistikoki esangarriena hormonen mailaren erregulazioa izan zen, eta, esaterako, AFP, FSHB, VAMP7 edo ESR1 geneak aurresandakoen artean daude.

3. irudia. Mir-2284/mir-2285 familiako miRNAen adierazpen maila ehun bakoitzean. A. mir-2284/mir-2285 familiako miRNA adierazpena ehun bakoitzean, milioiko irakurketetan (CPM) adierazita B. CPM > 1eko adierazpena duten mir-2284/mir-2285 familiako miRNA kopurua ehun bakoitzean.



Familia honen jatorri taxonomiko zehatza aztertzeko, Artiodactyla ordeneko hausnarkariak diren eta ez diren 13 espezieren genometan eta gizakiarenean familia hauetako miRNAen presentzia aztertu zen, genomen aurkako binakako lerrokaketak eginez. Espero bezala, hausnarkariak diren espezieetan miRNA familia-kide kopuru handiak aurkitu ziren. Bereziki interesgarria da zetazeoetan (*Orcinus orca* eta *Balaenoptera amphibius*) ere aurkitu zirela sekuentzia hauek, baina ez hausnarkariak ez ziren beste bi espezieetan (gameluan eta txerrian). Informazio honetan oinarrituta, familiaren agerpena duela 60 milioi urte inguru datatu ahal izan dugu, hausnarkarien eta zetazeoen arteko banaketaren aurretik (4. irudia).

4. irudia. Hausnarkarietan eta hausnarkariak ez diren beste espezie batzuekin egindako akordiozko zuhaitz filogenetikoa, espezie bakoitzean aurkitzen diren mir-2284/mir-2285 familiako miRNAak erakusten dituena. Asteriskoz adierazi da miRNA familia honen proposatutako agerpena. (*)



4. Ondorioak

Lan honetan ardiaren miRNAen adierazpen atlas bat sortu dugu hainbat RNA ez kodetzaile txikien esperimentuak era integratuan aztertuz. Gainera, aurretik kontuan hartu ez diren eta gure lanean detektatu ditugun karakterizatu eta anotatu gabeko ehunka miRNA sartu ditugu gure analisietan. Gure analisiek miRNA molekulen espezien zeharreko kontserbazioaren ideiekin bat datoz, baina baita ere azpimarratu nahiko genuke hausnarkarien eboluzioan klado-espezifikoak diren miRNA molekulen espantsio eta berrikuntzen potentziala, mir-2284/mir-2285 familiaren kasua bezala. Lan honetan bildutako lagin eta datu guztiak eta egindako miRNA molekulen adierazpen banaketa eta espezifizitate

analisiak oso erabilgarriak izan daitezke ardiaren Genomika eta albaitaritza arloetan, izan ere ardiaren 21 ehunetako miRNA molekulen adierazpenari buruzko informazioa eskaintzen du.

5. Etorkizunerako planteatzen den norabidea

Etorkizunera begira, hausnarkarietan gertaturiko mir-2284/mir-2285 familiaren hedapenean sakontzea komenigarria litzateke, bai eta familia honetako miRNA molekulek zein funtzio duten ikertzea. Gainera, ikerketa-lan desberdinen arteko konparagarritasuna handitzeko, RNA erauzketa, liburutegi prestaketa eta RNA-seq egiteko metodo estandarizatu bat finkatu beharko litzateke, datu base eguneratu eta fidagarri baten garapenarekin batera.

6. Erreferentziak

Bartel, D. P. (2004). MicroRANs: Genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, 116(2), 281-297. https://doi.org/10.1016/S0092-8674(04)00045-5

Bartel, D. (2018). Metazoan MicroRNAs. *Cell*, 173(1), pp.20-51. https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.03.006

Bilbao-Arribas, M., Abendaño, N., Varela-Martínez, E., Reina, R., De Andrés, D., & Jugo, B. M. (2019). Expression analysis of lung miRNAs responding to ovine VM virus infection by RNA-seq. *BMC Genomics*, 20(1). https://doi.org/10.1186/s12864-018-5416-0

Bilbao-Arribas, M., Guisasola-Serrano, A., Varela-Martínez, E., & Jugo, B. M. (2023). The sheep mirnaome: Characterization and distribution of mirnas in 21 tissues. *Gene*, *851*, 146998. https://doi.org/10.1016/j.gene.2022.146998

Bushati, N., & Cohen, S. M. (2007). Microrna functions. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 23(1), 175-205. https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.23.090506.123406

Clauss, M., Hume, I.D. & Hummel, J. (2010). Evolutionary adaptations of ruminants and their potential relevance for modern production systems. *Animal* 4, 979–992. https://doi.org/10.1017/S1751731110000388

Davis, C. J., Clinton, J. M., & Krueger, J. M. (2012). MicroRNA 138, let-7b, and 125a inhibitors differentially alter sleep and EEG delta-wave activity in rats. *Journal of Applied Physiology*, 113(11), 1756–1762. https://doi.org/10.1152/japplphysiol.00940.2012

García-López, J., Brieño-Enríquez, M. A., & Del Mazo, J. (2013). MicroRNA biogenesis and variability. *Biomolecular Concepts*, 4(4), 367-380. https://doi.org/10.1515/bmc-2013-001

Hammond, S. (2015). An overview of microRNAs. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 87, 3-14. https://doi.org/10.1016/j.addr.2015.05.001

Kozomara, A., Birgaoanu, M. & Griffiths-Jones, S. (2019). MiRBase: From microRNA sequences to function. *Nucleic Acids Res*. 47, D155–D162. https://doi.org/10.1093/nar/gky1141

Ludwig, N., Leidinger, P., Becker, K., Backes, C., Fehlmann, T., Pallasch, C., … Keller, A. (2016). Distribution of miRNA expression across human tissues. *Nucleic Acids Research*, 44(8), 3865-3877. https://doi.org/10.1093/nar/gkw116

Pacholewska, A., Mach, N., Mata, X., Vaiman, A., Schibler, L., Barrey, E., & Gerber, V. (2016). Novel equine tissue miRNAs and breed-related Mirna expressed in serum. *BMC Genomics*, 17(1). https://doi.org/10.1186/s12864-016-3168-2

Pillai, R. S. (2005). Microrna function: Multiple mechanisms for a tiny rna? *RNA*, 11(12), 1753-1761. https://doi.org/10.1261/rna.2248605

Saliminejad, K., Khorram Khorshid, H., Soleymani Fard, S. & Ghaffari, S., (2018). An overview of microRNAs: Biology, functions, therapeutics, and analysis methods. *Journal of Cellular Physiology*, 234(5), 5451-5465. https://doi.org/10.1002/jcp.27486

Salavati, M., Caulton, A., Clark, R., Gazova, I., Smith, T.P.L., Worley, K.C., Cockett, N.E. & Clark, E.L., (2020). Global Analysis of Transcription Start Sites in the New Ovine Reference Genome (Oar rambouillet v1.0). *Front. Genet*. 11, 580580 https://doi.org/10.3389/fgene.2020.580580

Sielemann, K., Hafner, A. & Pucker, B. (2020). The reuse of public datasets in the life sciences: Potential risks and rewards. *Peer J*, 8, e9954. https://doi.org/10.7717/peerj.9954

Sun, H.Z., Chen, Y. & Guan, L.L. (2019). MicroRNA expression profiles across blood and different tissues in cattle. *Sci. Data*, 6, 190013. https://doi.org/10.1038/sdata.2019.13

Svoronos, A. A., Engelman, D. M., & Slack, F. J. (2016). Oncomir or tumor suppressor? the duplicity of micrornas in cancer. *Cancer Research*, 76(13), 3666–3670. https://doi.org/10.1158/0008-5472.can-16-0359

VanRenterghem, B., Morin, M., Czech, M.P. & Heller-Harrison, R.A. (1998). Interaction of insulin receptor substrate-1 with the σ3A subunit of the adaptor protein complex-3 in cultured adipocytes. *J. Biol. Chem*. 273, 29942–29949. https://doi.org/10.1074/jbc.273.45.29942

Varela-Martínez, E., Abendaño, N., Asín, J., Sistiaga-Poveda, M., Pérez, M. M., Reina, R., ... Jugo, B. M. (2018). Molecular signature of aluminum hydroxide adjuvant in ovine PBMCs by integrated mrna and microrna transcriptome sequencing. *Frontiers in Immunology*, 9. https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02406

Varela-Martínez, E., Bilbao-Arribas, M., Abendaño, N., Asín, J., Pérez, M., De Andrés, ... Jugo, B. M. (2020). Whole transcriptome approach to evaluate the effect of aluminium hydroxide in ovine encephalon. *Scientific Reports*, 10(1). https://doi.org/10.1038/s41598-020-71905-y

Wang, C., Li, F., Deng, L., Li, M., Wei, M., Zeng, B., Wu, K., … Zhang, H. (2021). Identification and characterization of miRNA expression profiles across five tissues in giant panda. *Gene*, 769, 145206. https://doi.org/10.1016/j.gene.2020.145206

Westholm, J. O., & Lai, E. C. (2011). Mirtrons: Microrna biogenesis via splicing. *Biochimie*, 93(11), 1897-1904. https://doi.org/10.1016/j.biochi.2011.06.017

Yanai, I., Benjamin, H., Shmoish, M., Chalifa-Caspi, V., Shklar, M., Ophir, R., ... Shmueli, O. (2004). Genome-wide midrange transcription profiles reveal expression level relationships in human tissue specification. *Bioinformatics*, 21(5), 650-659. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bti042

7. Eskerrak eta oharrak

Lan hau Gene izeneko aldizkarian argitaratu da aurten (Bilbao-Arribas et al., 2023), eta UPV/EHUk babestutako Genomika eta Osasuna ikerketa-taldearen baitan burutu da. M. Bilbao-Arribasek UPV/EHUko doktorego aurreko kontratua izan du (PIF 17/306) eta E. Varela-Martínez-ek Europako Next Generation Funds-en bidezko finantziazioa du Margarita Salas kontratu baten bidez (MARSA21/83). Eskerrak eman nahi dizkiegu argitaratu gabeko emaitzak erabiltzen utzi dizkiguten ikertzaileei.

Bio oinarrituak diren dioletatik lortutako poliol berrien esplorazioa eta sintesia

Ane Olazabal[1,2], Andere Basterretxea[1], Harotz Sardon[2], Coralie Jehanno[1,2]

[1]POLYKEY POLYMERS, Joxe Mari Korta Zentroa, Tolosa etorbidea, 72, 20018 Donostia-San Sebastian, Espainia

[2]POLYMAT, Euskal Herriko Unibertsiatea UPV/EHU, Tolosa etorbidea, 72, 20018, Donostia-San Sebastián, Espainia

Ane.olazabal@polykey.eu

Laburpena

Poliuretanoen merkatua **polimeroen** industrian gehien produzitzen diren materialen artean seigarren postuan daude. Poliuretanoak poliolak eta isozianatoak nahastuz lortzen dira. Azken urte hauetan ingurumena zaintzearen kontzientzia geroz eta nabarmenagoa da, eta honetarako, polimeroen industriak hainbat aldaketa egin behar ditu. Aldaketa horietako bat, erregai fosilak alde batera uztea eta energia berriztagarrietatik lortzen diren materia primak erabiltzea da. Honetarako, proiektu honek, poliuretanoak osatzen dituen **poliolen** sintesia garatzen du, poliol hauek bio oinarrituak diren monomeroen sintesian zentratuz.

Hitz gakoak: poliuretano, polimero eta poliol

Abstract

*The **polyurethane** market is the sixth most produced in the **polymer** industry. Polyurethanes are obtained by mixing polyols and isocyanates. In recent years, the awareness of protecting the environment has become more and more prominent, and for this, the polymer industry needs to make several changes. One of these changes is the abandonment of fossil fuels and the use of raw materials obtained from renewable energies. For this, this study develops the synthesis of **polyols** that make up polyurethane, focusing on the synthesis of monomers that are bio-based.*

Keywords: polyurethane, polymer, polyols

1. Sarrera eta motibazioa

Plastikoak gaur egun, denok erabili eta aukeratzen ditugun materialak dira beraien prozesagarritasun, iraunkortasun eta erabiltasunagatik (Hong eta al., 2017). Beraiei esker hainbat aplikazio desberdin bete ahal izan dira, janaria gordetzekoa, medikamentu askoren garraioa eta baita automobilen munduan ere beraien garrantzia izan dute (Jehanno eta al., 2019). Baina gatazka handia sortzen ari dira hauen produkzio eta kontsumoak, beraien materia primak erregai fosiletatik baitatozte. Hainbat teoria pesimistenek diote, 2050 urterako kontsumitzen den erregai fosilen %20a plastikoen produkziorako izango dela. Dependentzia handi honek, gatazka handia sor dezake, kontsumo honek CO_2 kantitate handia igortzen baitu atmosferara honek dakartzan ondorio guztiak jakinez (Mülhaupt eta al., 2013). Gainera, erabiltzen den olio gordinaren prezioen gora behera hauek, plastikoen prezioan zuzenki influentziatuko dute. Honegatik da hain garrantzitsua materia prima hauek erabili ordez, beste iturri berriztagarriagotik lortzea materialak ondoren plastikoetan erabili ahal izateko (Fagnani et al., 2021). Batetik bestera pasatzeko erronka handienetako bat, ezaugarri berdinak dituzten plastiko bio oinarrituak lortzea izango litzateke.

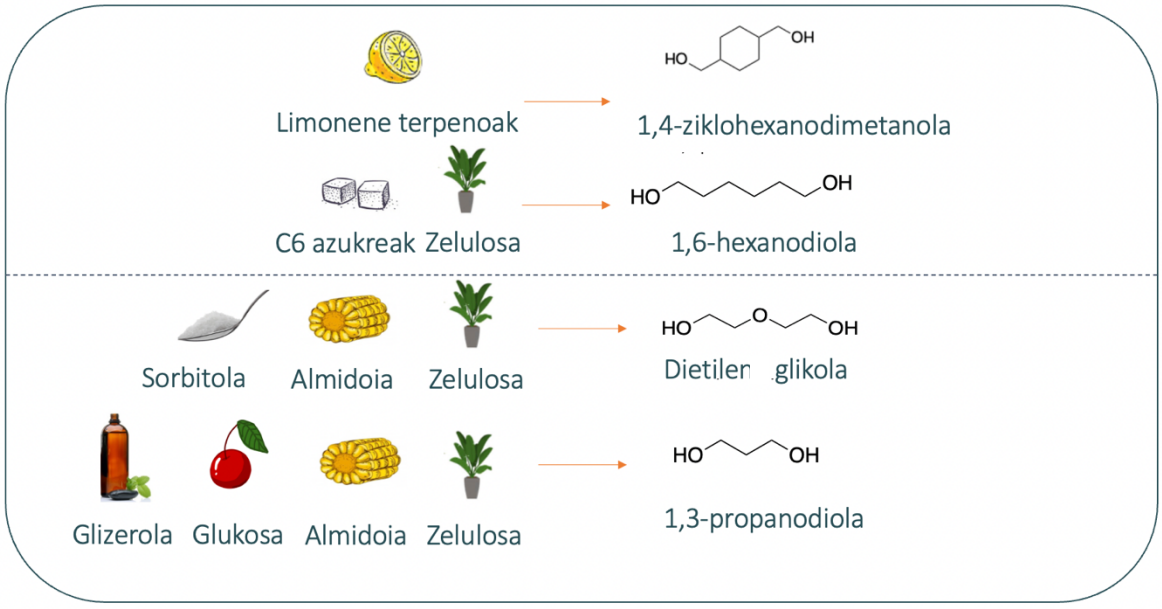
Poliuretanoen kasuan, mundu mailako merkatuan, 2018. urtean $ 55 bilioiko produkzioa izan dutela estimatu zen eta honek gora egingo duela hurrengo urteetan. Poliuretanoek dituzten

ezaugarri moldakorrengatik, hainbat aplikazio desberdin dituzte, surfaktante moduan edota termoplastikoa den elastomero moduan erabil daitezke. Poliuretanoak printzipalki bi osagaiz daude definituak, isozianatoz eta poliolez. Poliolaren talde funtzionalak (-OH) isozianatoen kate alifatikoaren muturrean duten talde funtzionalekin (-NCO) erreakzionatuz lortzen dira hain zuzen ere poliuretanoak (Reghunadhan et al., 2017).

Materia prima berriztagarriak erabiltzeko xedearekin, poliuretanoen munduan, bi aukera egongo lirateke, isozianato bio oinarrituak erabiltzea edota poliol bio oinarrituak. Isozianato bio oinarrituak badaude jada industrialki lor daitezkeenak, baina ikasketa hau polieter poliol bio oinarrituetan zentratuko da, nahiz eta gaur egun industrialki erabilgarri dauden monomero bio oinarrituen eskaintza eskasa izan (Maisonneuve et al.,2015). Monomero hauek bifuntzionalak edota multifuntzionalak izan daitezke; bifuntzionalen artean, dietilen glikola, 1,3-propanodiola edota 1,6-hexanediola aurki daitezke. Hauek poliuretanoen formulazioan sartuz, portzentaia bat bio oinarritua izatea lortuko da. Aipatutako polieter poliolen kasurako, iturri berriztagarri desberdinak izan dira ikertuak literaturan, hauen artean landare olioak aztertuenak eta erabilienak izanik (Desroches et al, 2012). Ezaugarri desberdinak lortu nahi badira, ohikoena polieter poliol hauek aldatzea izanen da. Aldatu daitekeen ezaugarri garrantzitsuetako bat, polieter poliolen pisu molekularra, funtzionalitatea eta estruktura izango lirateke. Gehienetan, polieter poliol motzak poliuretano gogorrentzako izango lirateke eta luzeagoak poliuretano biguinentzako.

Lan honetan, laburbiltzen dira monomero bio oinarritu desberdinen sintesi bideak, hauek poliuretanoen industrian inplementatzeko erronkak nabarmenduz. Hainbat monomero bio oinarritu ikertu dira, hauen potentziala goraipatuz. Monomeroak hurrengoak izanik: 1,6-hexanodiola,1,4-ziklohexanodimetanola, 1,3-propanodiola eta dietilen glikola (1. irudia).

1. irudia. Erabilitako monomeroak eta hauen jatorri bio oinarrituak



2. Arloko egoera eta ikerketaren helburuak

Gaur egun poliuretanoen industriak ez ditu osagai bio oinarrituak erabiltzen eta esan bezala, oso garrantzitsua da aldaketa hau ematea, helburu desberdinak lortu behar direlako.

Helburu nagusia bio oinarrituak diren polieter poliolen sintesia ematea da, hauek ondoen poliuretanoen industrian inplementatu ahal izateko. Honetarako, monomero desberdinak erabiliko dira eta hauek polimerizatu, homopolimeroak edota kopolimeroak lortu ahal izateko.

- Azido base nahasketa erabiliko da katalizatzaile moduan, honek organometalikoak diren katalizatzaile desberdinak ordezkatuz
- Eskalaz igotzea ere saiatuko da, ondoren poliol hauek industrian erabili ahal izateko
- Poliuretanoen formulazio desberdinetan sartzea
- Polykey enpresak patentatua duen prozesua monomero bakoitzari moldatu, tenperatura edota denbora desberdinak erabiliz
- Organokatalizatzaile bat erabiliko da eta ez katalizatzaile organometalikoa dena.

3. Ikerketaren muina

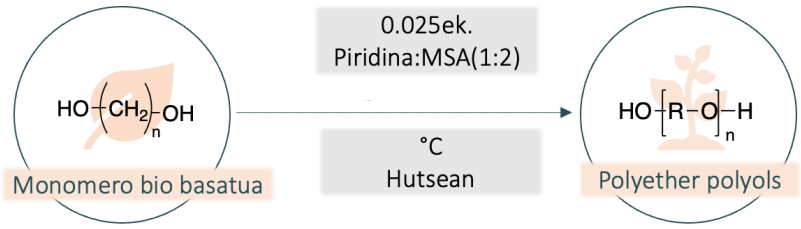
3.2 Katalizatzailearen prestakuntza, nahasketaz

Katalizatzailea azido bat, azido metanosulfonikoa eta base bat, piridina nahastuz prestatu zen, 2:1 eko erlazioan (azido metanosulfonikoa eta piridina), 15 minutuz 100 ºC-tara, likido garden eta homogeneo bat lortu arte. Base desberdinak frogatu ziren nahasketan, baina prezio efizientzia erlazioa begiratuz, aproposena piridina eta azido metanosulfonikoak osatzen duten organokatalizatzailea izango litzateke. Organokatalizatzaile hau izango da ondoren erabiliko dena sintesi guztiak aurrera eraman ahal izateko.

3.2. Monomero desberdinen sintesia

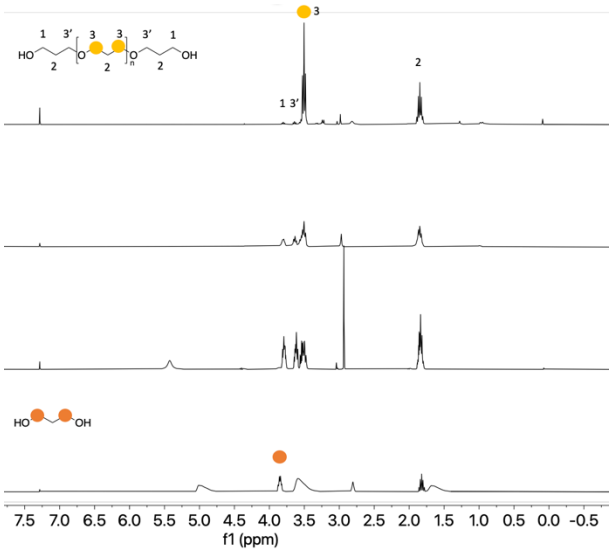
Erabiltzen diren monomeroak hurrengoak dira: dietilen glikola, 1,3-propanodiola, 1,6-hexanediola eta ziklohexanodimetanola. Sintesia bi eskala diferenteetan burutu zen, laborategi eskalarako monomeroaren ≈15g erabili ziren, lehenago prestatutako 0.025 ekibalentzia molar organokatalitzailearekin nahastuz. Sintesia 100 ml-ko matraz batean eman zen, irabiagailu magnetiko baten laguntzaz. Hau aurretik berotutako olio bainu batean sartu zen, 130 °C , 150 °C eta 180 °C-tara 24 orduz tenperatura bakoitza, disolbatzailerik erabili gabe (2. irudia).

2. irudia. Prozesuaren eskema orokorra



Sintesia bukatu ondoren, karakterizazio lan guztiak egin ziren lortutako polimeroekin. Prozesuaren zinetikak ^{1}H NMR bidez jarraitu ziren (3. irudia). Ondoren, analisi desberdinak egin ziren, ^{13}C NMR, GPC, TGA eta DSC, hauen ezaugarriak (kristalinitatea, adibidez) zeintzuk ziren jakin ahal izateko (1. taula).

3. irudia. ^{1}H NMR desberdinak 1,3-propanodiolaren sintesian



1. taula. Monomero desberdinak erabiliz lortutako emaitzak

Monomeroa	Iturri bio oinarritua	Monomero konbertsioa	Pisu molekularra (g/mol)
Dietilen glikol	Sorbitola, almidoia eta zelulosa	60-80%	6000
1,3-propanodiola	Glizerola, glukosa, almidoia, zelulosa	>99%	2000
1,6-hexanediola	C6 azukreak eta zelulosa	>99%	2000
Ziklohexanodimetanol a	Terpenoak	>99%	2000

Laborategiko eskalan frogatu ondoren, prozesu berdina 1litroko erreaktore batean egin zen, hau da, eskala handian. Lehenengo pausuetan, prozesua optimizatu zen, irabiagailu mekanikoa erabiliz, hutsune handiago eta kontrolatuagoak probatuz eta tenperatura homogeneoan.

4. Ondorioak

Ondorioztatu daiteke organokatalizatzaile bat erabiliz, bio oinarrituak diren polimero desberdinak lortu direla. Lortutako azken polimero hauek karakterizatu ondoren, hauen ezaugarriak ondo ezagutu ziren, bakoitzak bere ezaugarri propioak edukiz. Polieter poliol desberdinen artean desberdintasunak ikus daitezke, beraz bakoitzak industria aplikazio desberdinak eduki ditzazke.

Gainera, eskala desberdinetan eman daitekeen prozesua dela ikusi da, honek industriara emateko saltoa erreztuz.

5. Etorkizunerako planteatzen den norabidea

Etorkizunean, monomero bio oinarritu gehiago aztertu nahi dira, prozesu berdina erabiliz polieter poliolen katalogoa handitu ahal izateko eta ondoren, poliuretanoen formulazioan erabili ahal izateko, baina betiere, hauek aplikazio desberdinetan erabili ahal izateko.

Jada sintetizatuak izan diren poliolak funtzionalizatu nahi dira hauen funtzionalitatea, orain bikoa dena, handitu ahal izateko, hau da, filmeak egin ahal izateko.

Eskala handiagoak ere erabiliko dira industria mailara iritsi ahal izateko eta prozesuak jada optimizatuak egon daitezen ondoren produkzioa industria mailara iristen denerako.

6. Erreferentziak

Desroches, M.; Escouvois, M.; Auvergne, R.; Caillol, S.;Boutevin, B. (2012)From Vegetable Oils to Polyurethanes: Synthetic Routes to Polyols and Main Industrial Products. *Polym. Rev.,* 52 (1), 38−79. https://doi.org/10.1080/15583724.2011.640443

Fagnani, D. E.; Tami, J. L.; Copley, G.; Clemons, M. N.; Getzler, Y. D. Y. L.; McNeil, A. J.(2021) 100th Anniversary of Macromolecular Science Viewpoint: Redefining Sustainable Polymers. *ACS Macro Lett., 10,* 41.
https://doi.org/10.1021/acsmacrolett.0c00789?urlappend=%3Fref%3DPDF&jav=VoR&rel=cite-as

Hong, M.; Chen, E. Y.-X.(2017) Chemically Recyclable Polymers: A Circular Economy Approach to Sustainability. *Green Chem., 19* (16), 3692−3706. https://doi.org/10.1039/C7GC01496A

Jehanno, C.; Sardon, H. Dynamic Polymer Network Points the Way to Truly Recyclable Plastics (2019). *Nature, 568 (7753),* 467−468. https://doi.org/10.1038/d41586-019-01209-3

Maisonneuve, L.; Lamarzelle, O.; Rix, E.; Grau, E.; Cramail, H. (2015) Isocyanate-Free Routes to Polyurethanes and Poly(Hydroxy Urethane)s. *Chem. Rev., 115 (22)*, 12407−12439. https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.5b00355?urlappend=%3Fref%3DPDF&jav=VoR&rel=cite-as

Reghunadhan, A.; Thomas, S. Datta, J .; Haponiuk, J (2017) *Polyurethanes: Structure, Properties, Synthesis, Characterization, and Applications in Polyur- ethane Polymers: Blends and Interpenetrating Polymer Networks1st,* Elsevier, 1−16.

7. Eskerrak eta oharrak

Eskerrak eman nahiko nituen Espaniako Gobernuko Zientzia eta Inobazio Ministerioari. Baita Polykey Polymer “spinn-off” eko talde osoari.

1 motako diabetesarekin asoziaturiko RNA ez kodetzaile batek mikropeptido bat ekoiztu dezake

Jon Mentxaka[1,2], Koldo García[3], Henar Rojas[1,2], Ane Olazagoitia[1], Leire Bergara[1], Luis Manuel Mendoza[2], Ainara Castellanos[1,4,5], Izortze Santin[1,2,5]

[1]Euskal Herriko Unibertsitatea UPV/EHU, [2]Instituto Biocruces Bizkaia, [3]Biodonostia Health Research Institute, [4]IKERBASQUE Basque Foundation for Science, [5]CIBERDEM
jon.mentxaka@ehu.eus

Laburpena

1 motako diabetesa oso zabaldurik dagoen eritasun autoimmune multifaktorial bat da, zeinean infekzio enterobiralek patologiaren garapenean eragiten duten genetikoki suszeptibleak diren indibiduoetan. Testuinguru honetan, ohituraz ez kodetzaile gisa sailkatzen diren RNA geneetatik ekoiztu litezkeen mikropeptidoak gaixotasunaren garapenean garrantzitsuak izan litezkeela uste dugu. Hipotesi honekin, erribosomei atxikiriko RNAren sekuentziazioa burutu dugu pankreako ß zelulen lerro batean, infekzio birala imitatzen duen baldintzen pean. Tresna bioinformatikoen bidez mikropeptidoren bat kodetzeko aukera duten hautagaien zerrenda bat lortu ez ezik, metodoa balioztatu dugu hautagai batetik eratorritako peptido baten ekoizpena *in vitro* frogaturik.

1motako diabetesa, RNA luze ez kodetzailea, mikropeptidoak, pankreako ß zelulak

Abstract

Type 1 diabetes is a chronic, multifactorial and autoimmune disease in which enteroviral infections seem to be a crucial triggering factor in genetically susceptible individuals. Although traditionally disregarded, non-coding RNAs have emerged as key players in the disease, especially those which can produce small peptides from short open reading frames. In this study we have sequenced ribosome-bound RNA in a pancreatic ß cell line under basal and viral-insult-mimicking conditions. By usage of several bioinformatical tools, we have generated a list of RNA gene candidates with micropeptide coding potential. Additionally, we have validated this approach in vitro by identifying a non-coding RNA gene which can produce a putative 109 aminoacid peptide.

Type 1 diabetes, long non-coding RNA, micropeptides, pancreatic ß cells

1. Sarrera eta motibazioa

1 motako diabetes mellitusa (1DM) gaur egun gero eta zabalduago dagoen eritasun kroniko eta autoimmune bat da. Bere ezaugarri nagusia pankreako ß zelulen suntsipen progresiboa da, immunitate-sistemako zelulek eragindako pankreako irlatxoen kontrako eraso jarraituak direla eta (Eizirik *et al,* 2009). ß zelulen galerak eragindako odoleko glukosa maila altua orekatu ahal izateko, 1DMren pazienteak bizitza osorako intsulina tratamendua jasotzera beharturik daude, izan ere oraindik ez da 1DMri aurre egiteko sendabiderik ezagutzen.

Beste gaixotasun askoren antzera, 1DM gaixotasun multifaktoriala da; hau pairatzeko arriskuak osagai genetiko garrantzitsua eduki arren (Todd *et al*, 2007), genetikak soilik ezin dezake gaixotasunaren herentzia osoa azaldu. Badirudi ingurugiroko zenbait faktorek zeresan handia dutela, batez ere gaixotasunaren hasierako etapetan. Zehazki, ikerketa anitzek enterobirus infekzioen eta 1DMren garapenaren arteko lotura azpimarratu dute predisposizio genetiko esangarria daukaten indibiduoetan (Op de Beeck eta Eizirik, 2016, Yeung *et al*, 2011). Pare bat adibide jartzearren, 1DMrekin diagnostikatu-berri izan diren pazienteen odolean birus hauen RNA detektatu izan da ikerketa batean eta, beste batean, birusen kapsidaren VP1 proteina 1DM daukaten pazienteetan, indibiduo osasuntsuetan baino proportzio askoz altuagoarekin agertzen dela egiaztatu da (Richardson *et al*, 2009).

Hala eta guztiz ere, ez ditugu ezagutzen 1DMren garapena baldintzatzen duten aldagai guztiak. Azken urteotan, gero eta arruntagoak bihurtu dira genoma osoko asoziazio ikerketak (ingelesetik GWAS; *genome wide association studies*). Haietan, fenotipo edo gaixotasun zehatzen eta

genomako nukleotido bakarreko polimorfismoen (ingelesetik SNP; *single nucleotide polymorphism*) arteko lotura edo asoziazioa aztertzen da, gaixotasun horietan garrantzia nabarmena izan dezaketen SNPak identifikatu nahian. Bitxiki, SNP hauetako asko (%10a baino gehiago), proteina kodetzaileak diren geneetan egon beharrean, RNA luze ez-kodetzaile (ingelesetik lncRNA; *long non-coding RNA*) deritzen geneetan kokatzen dira. Ustez, gene hauek proteina funtzionalak sortzeko gai ez diren arren, gero eta gehiago dira zelula osasuntsuen funtzioan baita gaixotasunen garapenean duten garrantzia deskribatzen duten artikuluak (Széll *et al*, 2016). 1DM ez da salbuespena noski, eta gaixotasunaren garapenarekin erlazionatuta dauden lncRNA anitz deskribatu dira, beste hainbeste oraindik aurkitzeke daudelarik (Akerman *et al*, 2017, Motterle *et al*,2015).

Gure ikerketan, 1DMren garapenarekin loturik egon daitezkeen lncRNAak aztertu ditugu, baina oraingoan pausu bat haratago joanda. Azken urteotan gene kodetzaile eta ez kodetzaileen paradigma tradizionala aldatuz joan da, sekuentziazio teknologia berrien agerpenarekin batera. Erribosomei loturiko RNAren sekuentziazioak antzina nekez imajinatu genitzakeen ustekabeak aurkeztu ditu, izan ere, lncRNA mordoa antzeman dira erribosomei loturik (Ingolia *et al*, 2011). Beste era batera esanda, ustez proteinak kodetzeko gai ez diren transkrito horiek, zenbait baldintzaren pean behintzat, peptidoak edo proteinak ekoizteko ahalmena izan dezakete (Bazzini *et al*, 2014, Anderson *et al*, 2015). Hain zuzen ere, honelako lncRNA geneen bila aritu gara gure ikerketan, zehazki 100 aminoazido inguru edo gutxiagoko mikropeptidoak kodetu ditzaketenen lncRNA-en bila. Horretarako, ohiko metodo neketsua ordeztu dezakeen metodo sinple eta azkarrago bat diseinatu dugularik.

2. Arloko egoera eta ikerketaren helburuak

lncRNA geneetatik eratorritako mikropeptidoek funtzio garrantzitsuak bete ditzakete; literaturan zenbait kasu daude deskribaturik (Li *et al*, 2021, Senís *et al*, 2021). Guri dagokigunez, 1 motako diabetes mellitusarekin erlazionaturiko mikropeptidoak identifikatu nahiko genituzke. Geure hipotesia hurrengoa da: Azaldu dudanez, arrisku genetikoa duten indibiduoetan, infekzio enterobiralak 1DMren abiarazle izan daitezke. Mekanismoa ezezaguna bada ere, egoera horretan baliteke normalean erribosomarekin interakziorik ez daukaten lncRNA molekulek erribosomara lotzeko joera izatea; izan ere deskribaturik dago estres egoeretan erribosomen erregulazioa galtzen dela, egoera normalen itzultzen ez diren transkritoak itzuli ditzaketelarik (Thomaidou *et al*, 2021). Honen ondorioz, gaixotasunaren garapenean eragin dezaketen mikropeptidoak ekoiztu daitezke; adibidez, pankreako ß zelulen neoautoantigeno bezala funtzionatu ditzaketenak.

Horrela, lan honetan bi helburu nagusi finkatu ditugu:

1) Potentzial kodetzailea duten lncRNA gene hautagaiak identifikatzeko metodo bat garatzea.
2) Garatutako metodoan oinarrituz, pankreako ß zeluletan 1DM-aren garapenean eragina izan ditzaketen mikropeptidoak identifikatzea.

3. Ikerketaren muina

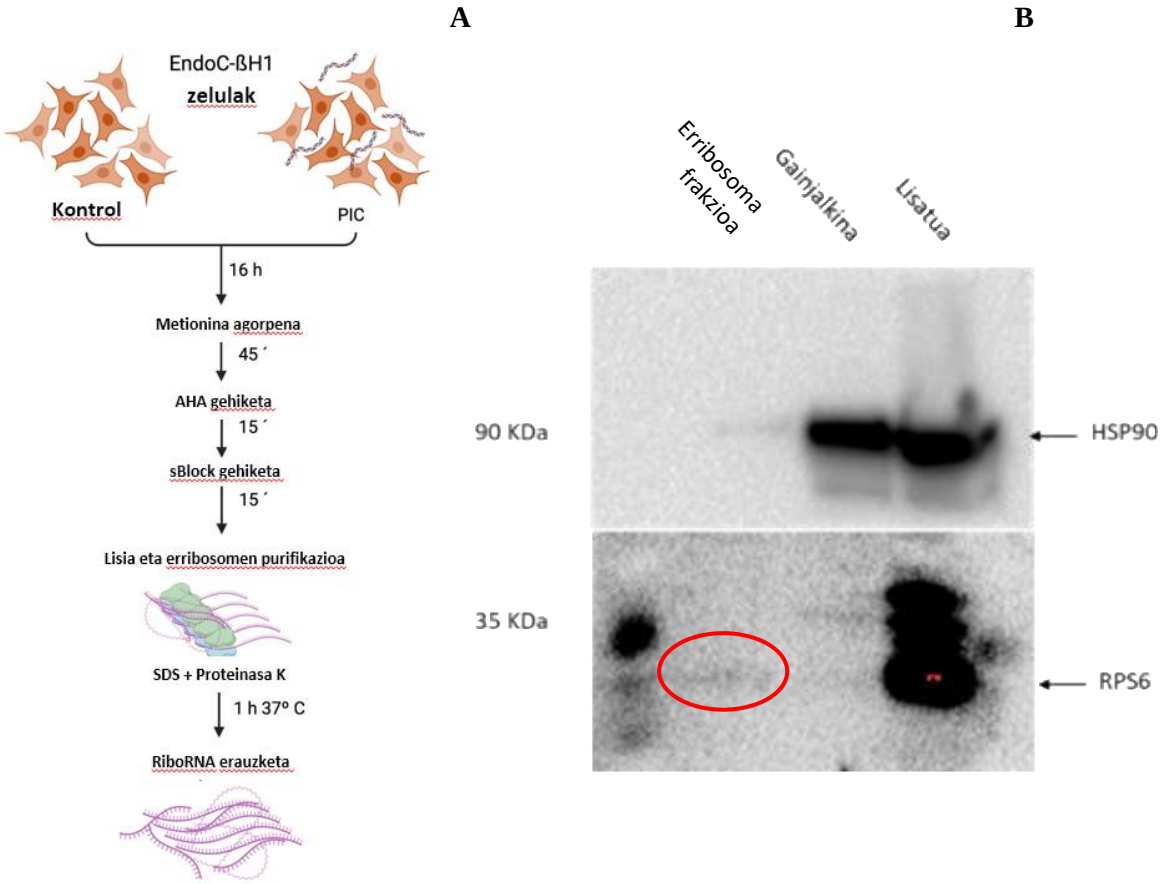
3.1 Erribosomei asoziaturiko RNAren erauzketa

Lehenik eta behin, gure ikerketa garatzeko, 1DM gaixotasunaren hasieran pankreako ß zelulek jasaten duten egoera errealari nolabait hurbiltzen zaion *in vitro* ingurunea prestatu dugu. Gaixotasunaren etapa goiztiarretan genetikoki suszeptibleak diren indibiduoetan infekzio biralak eman ohi dira. Egoera hori irudikatzeko, EndoC-βH1 deitzen den pankreako giza ß zelula-lerroa erabili dugu. Infekzio biralaren ordez, azido poliinosiniko:polizitidiliko (PIC) deritzon harizpi bikoitzeko RNA sintetikoa transfektatu diegu zelulei, benetako birus infekzio baten aurrean ematen den erantzun zelularra abiarazteko.

Ondoren, erribosomari asoziaturiko RNA eraucteari ekin genion. Erribosoman dagoen RNA aztertzeko ohiko metodoa "*Ribosome profiling*" deiturikoa da, zeinean, zelulak lisatu, RNAsarekin tratatu eta erribosomak ultrazentrifugazio bidez sedimentatzen diren, azkenik erribosomen barruan

babesturik dauden RNA zati motzak erauzi eta sekuentziatzeko. Nahiko prozesu neketsua eta konplexua denez, erribosomak "afinitatez" isolatzen dituen metodo komertzial bat erabili dugu: AHARIBO (Minati *et al*, 2021) (1A. Irudia). Horretarako, PICekin trataturiko eta tratatu gabeko zelulei hazkuntza medioa aldatu genien 16 ordutara, metionina gabeko medio bat jarriz. Behin zelulen metionina erreserbak agortuta, metioninaren homologoa den molekula bat gehitu zitzaion medioari (AHA, L-azidohomoalanina), zelulek metioninaren ordez erabili zezaten itzultzeko prozesuan ari ziren proteina eta peptido jaioberrietan. Azkenik, erribosomen elongazioa eta itzulpena blokeatzen duen molekula txikia (sBlock, AHARIBOren molekula propioa) gehitu genion medioari, erribosoma-RNA-peptido konplexu horiek "izozteko". EndoC-βH1 zelulak lisatu ziren, eta erribosomen purifikazioa AHAren afinitate ligando batez estalitako bihi magnetikoak erabiliz lortu zen (1B. Irudia). Erribosomei asoziaturiko RNA (riboRNA hemendik aurrera) hori erauzteko fenol:kloroformo:alkohol isoamiliko erauzketa tradizionala erabili genuen.

1. irudia. Erribosomei asoziaturiko RNAren prestaketaren diagrama (A) eta RPS6 erribosoma proteinaren western blot baten irudia, HSP90 karga kontrol gisa erabilita (B). Gorriz markatuta RPS6 proteina erribosomikoari dagokion banda, erribosoma frakzioan aberastua.



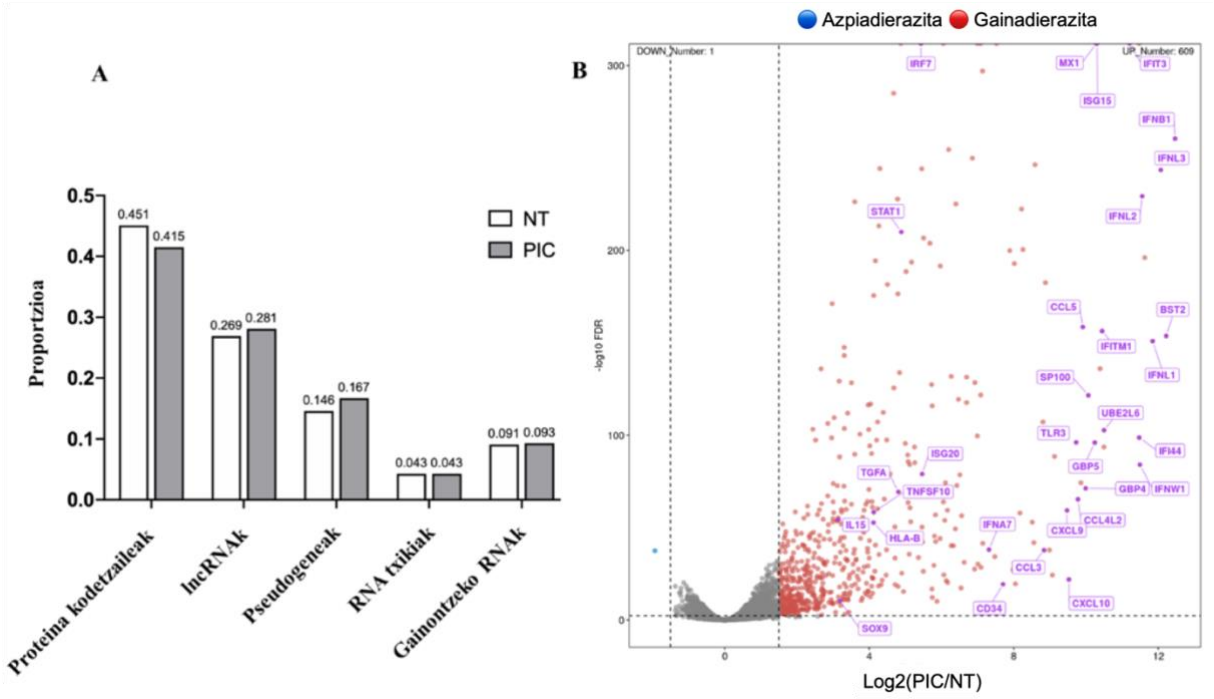
Azaldutako prozesu honekin 4 RNA lagin bikote prestatu genituen, PICekin trataturikoa eta kontrola bakoitzean. Gure riboRNAren kalitatea frogatuta eta onargarritzat hartuta, sekuentziatzera bidali genituen, RNAseq arrunt batean. Batez beste, kalitate onargarria zuten 131 milioi irakurketa ekoiztu ziren lagin bakoitzeko.

3.2 RNAseq datuen analisia

Sekuentziazioaren analisiari ekinik, irakurketa gehienak gene proteina kodetzaileei zegozkien (2A. irudia). Hauetatik 614 zeuden esangarritasun estatistikoarekin areagotuta PIC laginetan (log_2Fold Change > 1.5 eta FDR<0.05) eta infekzio birikoa simulatzeko PICaren eraginkortasuna frogatuz,

erantzun antibiral eta immunearekin erlazionaturiko geneak esangarriki areagotutako geneen artean oso aberasturik zeudela behatu genuen (2B. irudia).

2. irudia. RNAseq bitartez detektaturiko transkrito guztien biotipoen proportzioak (A) eta proteina kodetzaile geneen *volcano plot*a (B). Diferentzialki areagotutako gene askok erantzun immune eta antibiraleko seinaleztapen bidezidorretan dihardute



Beste alde batetik, lncRNA proportzio altua detektatu genuen, detektaturiko transkrito guztien %27 inguru zirelarik (2A. Irudia). Gainera PIC laginetan erribosomekin asoziaturiko lncRNA kopurua kontrol laginetakoa baino handiago zen, estres egoeren pean erribosomaren interakzio ezohikoen teoria babestuz. Aurrekoen antzera, 454 lncRNA aurkitu genituen erribosomekiko asoziazioan esangarriki areagotuta PIC laginetan eta beste 470 lncRNA PIC laginetan soilik detektatu genituen.

lncRNA hauek pankreako ß zelulen hanturan parte hartzen duten hautagaiak aurkitzeko abiapuntu ona izan daitezke, baina azkar aztertzeko gehiegi dira. Bilaketa fintzeko, gure hautagaien zerrenda, aurretiaz EndoC-βH1 zeluletan egindako *ribosome profiling* esperimentu batean (Thomaidou *et al*, 2021) identifikaturiko lncRNAekin eta GWAS ikerketetan 1 motako diabetesari loturiko SNPak dituzten lncRNAekin gurutzatu genuen. Horrela, interes bereziko 52 hautagairaino mugatu genuen zerrenda.

Azkenik, interes handia ezezik, mikropeptidoren bat kodetzeko ahalmena ere ebaluatu genuen gure hautagaien artean. Horretarako tresna eta baliabide bioinformatiko pare bat baliatu genituen. Alde batetik, nukleotido eta kodoien kontserbazio filogenetikoa kontuan hartuta, transkritoak puntuatzen dituen PhyloCSF programa eta, beste alde batetik, intereseko transkritoen irakurketa-ereduetatik (ORF, *open reading frame*) itzuli daitezkeen peptido edo proteinak analizatzen dituen CPC2 programa. Honela, gure irizpideen arabera, mikropeptido bat kodetzeko probabilitate handiena zuten hamar hautagai bildu genituen.

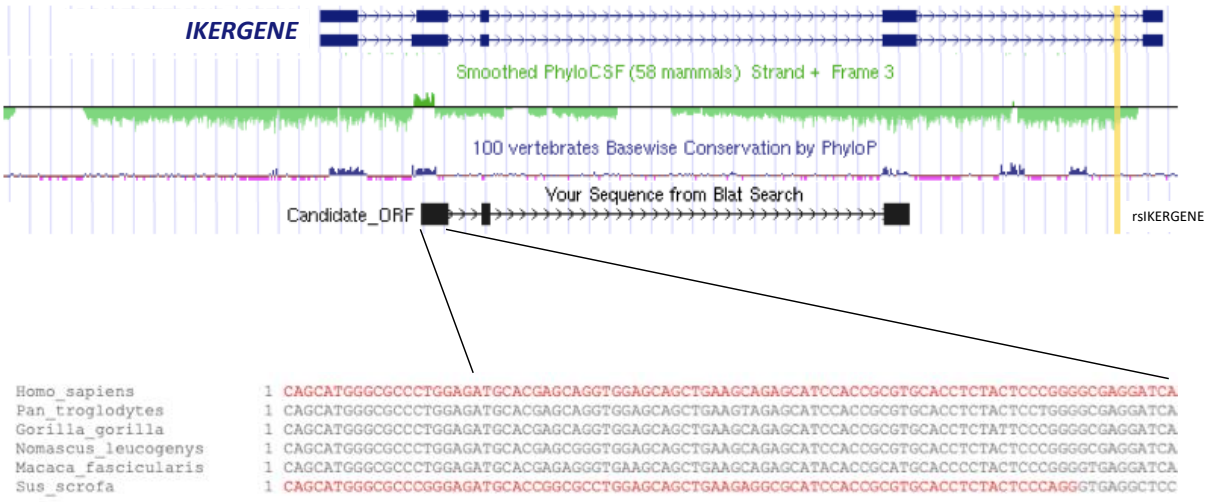
3.3 Metodoaren balioztapena

Hautagai horietatik lauk besterik ez zuten ATG trinukleotidoa euren mikropeptido potentzialaren hasiera kodoi gisa. Gauzak erraztearren, hasiera kanonikoa zeukatenekin jarraitu genuen. Horien artean *CRNDE* izeneko lncRNA genea agertu zen, gure ikerketaren arabera 84 aminoazidoko luzera duen

mikropeptido bat kodetzeko gai izan daitekeen hautagaia. Hain zuzen ere, gene hau jatorriz lncRNA bezala dago anotaturik, haatik, arestiko ikerlan pare batean HeLa zeluletan 84 aminoazidoko mikropeptido hori bera benetan kodetu dezakeela frogatu da (Szafron *et al*, 2015). Honek sendotasuna ematen dio orain arte jarraitutako estrategiari.

Horretaz gain, beste hautagai bat aukeratu genuen, hemen *IKERGENE* deitutako mikropeptidoa. *IKERGENE*k 1DMrekin asoziaturiko SNP bat dauka (rsIKERGENE), isoformen arabera exonikoa edo intronikoa dena. PhyloCSF algoritmoaren arabera, *IKERGENE*k kodoi kontserbazio nabarmena daukan eskualde bat du, hirugarren exoian hasita (3. Irudia). Transkritoaren sekuentzia CPC2 algoritmoan sartuta, kodetzailea izan daitekeen 330 nukleotidoko ORF bat identifikatu dezakegu. Intereseko ORF hori UCSC Genome Browserrean irudikatuta, agerikoa da ORFaren hasiera eta PhyloCSF zein kontserbazio gailurrak bat datozela (3. Irudia). Bestalde, hasierako ORFaren hasierako trinukleotidoa inguratzen duen sekuentzia, *Kozak* sekuentzia alegia, nahiko indartsua da TISPredictor programaren arabera.

3. Irudia. IKERGENE hautagaiaren kontestu genomikoa UCSC Genome Browserrean. Berdez PhyloCSF puntuazio *track*a, puntuazio positiboko pikoarekin. Behean ORFaren hasieraren sekuentzia zenbait primate espezietan (hasiera kodoia horiz).

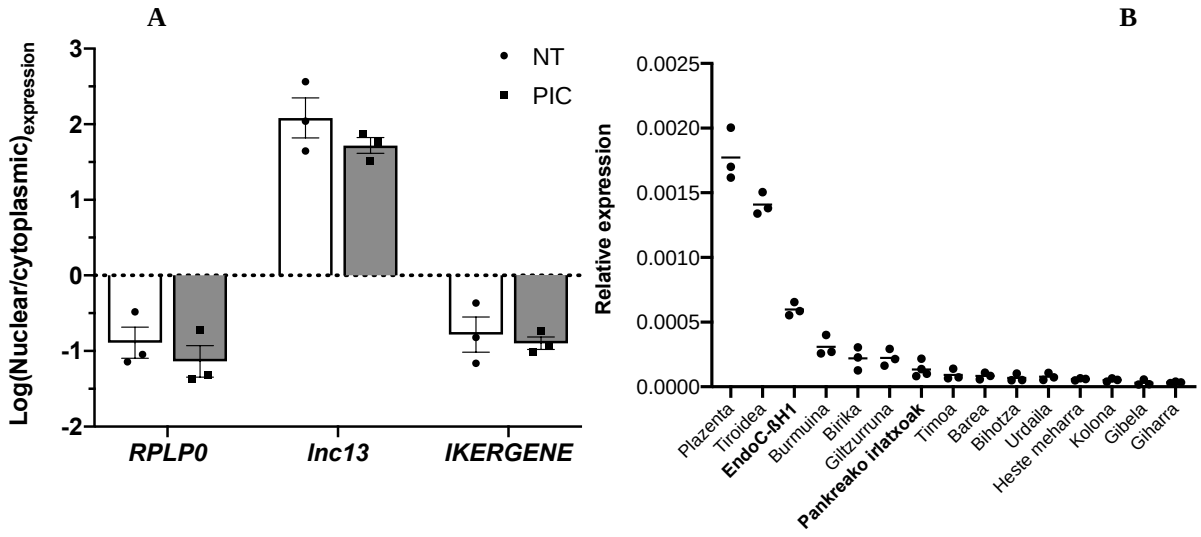


Hautagai honen aldeko ebidentziak ikusita, lncRNAren adierazpena aztertu genuen jarraian qPCRz *primer* espezifikoak erabilita, zenbait giza-ehunetan eta EndoC-ßH1 zelulen frakzio azpizelularretan ere (4B. Irudia). Timo eta plazentan detektatu genuen adierazpen maila altuena, aztertutako beste ehun gehienetako adierazpen maila nahiko baxua zelarik. EndoC-ßH1 zeluletan baita indibiduo osasuntsuen irlatxo pankreatikoetatik erauzitako RNA laginetan, *IKERGENE* transkritoaren adierazpen maila ehun gehienena baino nabarmen altuago zen.

Adierazpen azpizelularrari dagokionez, nukleoan aberatsagoak diren lncRNA transkritoak gene adierazpenaren erregulazioarekin lotu ohi dira, zitoplasman aberatsak direnak beste funtzio zelularrekin lotzen diren bitartean. Zentzuzkoa denez, mikropeptidoren bat kodetzeko gai diren lncRNAk zitoplasman daude aberastuta, RNA mezularien itzulpena zitoplasman dauden erribosometan gertatzen baita. Gure kasuan, *IKERGENE* bereziki β zelulen zitoplasman adierazten dela baieztatu genuen, bai egoera basalean baita PIC-ekin transfektatutako zeluletan (4A. Irudia).

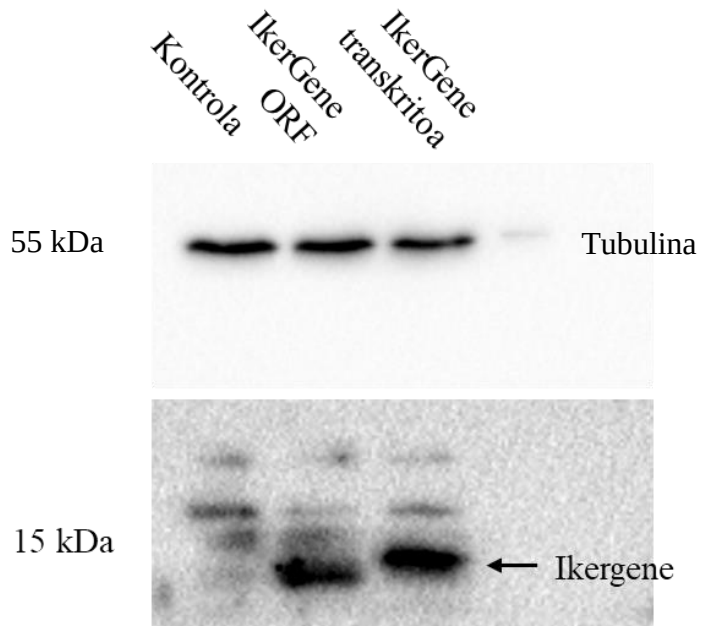
4. irudia. *IKERGENE*ren adierazpena EndoC-ßH1 zelulen RNA frakzio azpizelularretan (A). Aberasketa log(adierazpena nukleo frakzioan/adierazpena zitoplasma frakzioan) bezala kalkulatu zen; kontrol gisa *RPLP0* eta *lnc13* geneak erabili ziren, zeinak zitoplasman eta nukleoan aberasturik dauden hurrenez

hurren. (B) *IKERGENE*ren adierazpena zenbait giza ehun desberdinetan, erreferentzia gisa *RPLP0* erabilita



*IKERGENE*k kodetu lezakeen ORFa gainadierazpen bektore batean klonatu genuen, 3' muturrean FLAG-tag etiketa bat gehituta. Mikropeptido potentzialaren tamaina 12 kDa ingurukoa da *Expasy Translate Tool* programaren arabera. Mikropeptidoaren presentzia *Western blot* bidez frogatu genuen gainadierazpenaren ondoren antiFLAG antigorputz poliklonal bat erabilita (5. Irudia). FLAG seinalea esperotako tokian agertu zen, 15 kDa inguruan, zentzuzkoa FLAG eta bereizlearen ~2 kDa gehiagarriak kontuan hartuta. Are gehiago, mikropeptidoaren ORF soila beharrean, RNA transkrito osoaren sekuentzia klonatzean, antzeko emaitzak lortu genituen (5. Irudia). Emaitza hauek mikropeptidoa ß zeluletan benetan ekoiztu daitekeela eta egonkorra dela frogatzen dute.

5. irudia. EndoC-βH1 zeluletan hautagaiaren ORF eta luzera osoko konstruktoak gainadierazi ziren. Mikropeptidoaren ekoizpena Western blot bidez frogatu zen antiFLAG antigorputza erabilita



4. Ondorioak

Hemen azaldutako ikerketan, 1DMrako espezifikoki, baina gaixotasun gehiagorako garrantzitsuak izan daitezkeen mikropeptido potentzialak identifikatzeko metodo eskuragarri bat garatu dugu. Gure ustetan, *in silico* egindako predikzioen eta *in vitro* egindako esperimentu biologikoen konbinazioan oinarritzeak indarra ematen diote estrategiari. Hain zuzen, jadanik mikropeptido kodetzaile bezala sailkatu den *CRNDE* genean identifikatu ezezik, orain arte deskribatu gabeko mikropeptido bat identifikatu dugula baieztatu dezakegu.

IKERGENE hautagaiak mikropeptido bat kodetzeko ezaugarri asko batzen ditu aztertutako tresna eta baliabideen arabera: kontserbazio filogenetiko puntuala, PhyloCSF piko positiboa, ATG *Kozak* sekuentzia indartsua kontserbazio pikoaren eskualdean eta baita CPC2 algoritmoak aurresandako potentzial kodetzailea. Gainera, kontuan hartu beharrekoa da lncRNA honen iturria erribosomei loturiko RNA sekuentziazioa dela. Honi adierazpen eta *Western blot* esperimentuetan lortutako emaitzak gehituz, ez dirudi burugabea *IKERGENE*k ß zeluletan mikropeptido bat kodetzeko ahalmena duela baieztatzea. Peptido honek izan ditzakeen funtzio edo eraginak aurrerago aztertu beharko dira.

Erabilitako metodo honek izan dezakeen eragozpenetako bat purifikaturiko erribosometatik erauzitako RNAren natura da. Testuan aipaturiko *ribosome profiling* teknikan erribosomaren barruan eta, hortaz, babesturik dauden RNA puskak erauzi eta sekuentziatzen dira. Gure AHARIBOn, ordea, erribosoma konplexuari atxikituriko RNA oro. Horrek bere abantailak eta berezitasunak ditu; erribosoma konplexuetan agertu daitezkeen lncRNA transkrito guztiek ez dute zertan itzultzen egon behar, baliteke itzulpen prozesuaren erregulazioan aritzea, edota beste edozein funtzio betetzea.

5. Etorkizunerako planteatzen den norabidea

Aurreko atalean iradoki bezala, *IKERGENE*ren mikropeptidoaren azterketa funtzionala burutzea litzateke hurrengo pausoa. Orain arte burututako *in vitro* esperimentuetan, mikropeptidoaren presentzia ORFa eta lncRNA transkrito osoa gainadieraziz frogatu da. Hurrengo erronka EndoC-ßH1 zeluletan dagoen mikropeptido endogenoa detektatzea izango litzateke, bai egoera basalean baita PIC tratamenduaren ostean, horretarako mikropeptidoaren aurkako antigorputz pertsonalizatu bat baliatuz *Western blot* eta immunofluoreszentzia esperimentuetan. Azken etapan, mikropeptidoak parte hartzen duen bidezidorra aurkitzen saiatuko ginateke, zelulak peptidoarekin berarekin tratatuz, *IKERGENE* lncRNA isilaraziz edota CRISPR bidez genea erabat ezabatuz adibidez, aldaketa hauek zelulen fisiologian eta gene adierazpenean daukaten eraginean aztertuz. Honela hobeto ulertuko genuke *IKERGENE*k 1DM gaixotasunean zenbaterainoko garrantzia izan lezakeen.

6. Erreferentziak

Akerman, I., Tu, Z., Beucher, A., Rolando, D. M. Y., Sauty-Colace, C., Benazra, M., Nakic, N., Yang, J., Wang, H., Pasquali, L., Moran, I., Garcia-Hurtado, J., Castro, N., Gonzalez-Franco, R., Stewart, A. F., Bonner, C., Piemonti, L., Berney, T., Groop, L., Kerr-Conte, J., … Ferrer, J. (2017). Human Pancreatic β Cell lncRNAs Control Cell-Specific Regulatory Networks. *Cell metabolism*, *25*(2), 400–411

Anderson, D. M., Anderson, K. M., Chang, C. L., Makarewich, C. A., Nelson, B. R., McAnally, J. R., Kasaragod, P., Shelton, J. M., Liou, J., Bassel-Duby, R., & Olson, E. N. (2015). A micropeptide encoded by a putative long noncoding RNA regulates muscle performance. *Cell*, *160*(4), 595–606

Bazzini, A. A., Johnstone, T. G., Christiano, R., Mackowiak, S. D., Obermayer, B., Fleming, E. S., Vejnar, C. E., Lee, M. T., Rajewsky, N., Walther, T. C., & Giraldez, A. J. (2014). Identification of small ORFs in vertebrates using ribosome footprinting and evolutionary conservation. *The EMBO journal*, *33*(9), 981–993

Eizirik, D. L., Colli, M. L., & Ortis, F. (2009). The role of inflammation in insulitis and beta-cell loss in type 1 diabetes. *Nature reviews. Endocrinology*, *5*(4), 219–226

Ingolia, N. T., Lareau, L. F., & Weissman, J. S. (2011). Ribosome profiling of mouse embryonic stem cells reveals the complexity and dynamics of mammalian proteomes. *Cell*, *147*(4), 789–802

Li, M., Shao, F., Qian, Q., Yu, W., Zhang, Z., Chen, B., Su, D., Guo, Y., Phan, A. V., Song, L. S., Stephens, S. B., Sebag, J., Imai, Y., Yang, L., & Cao, H. (2021). A putative long noncoding RNA-encoded micropeptide maintains cellular homeostasis in pancreatic β cells. *Molecular therapy. Nucleic acids*, *26*, 307–320

Minati, L., Firrito, C., Del Piano, A., Peretti, A., Sidoli, S., Peroni, D., Belli, R., Gandolfi, F., Romanel, A., Bernabo, P., Zasso, J., Quattrone, A., Guella, G., Lauria, F., Viero, G., & Clamer, M. (2021). One-shot analysis of translated mammalian lncRNAs with AHARIBO. *eLife*, *10*, e59303

Motterle, A., Gattesco, S., Caille, D., Meda, P., & Regazzi, R. (2015). Involvement of long non-coding RNAs in beta cell failure at the onset of type 1 diabetes in NOD mice. *Diabetologia*, *58*(8), 1827–1835

Op de Beeck, A., & Eizirik, D. L. (2016). Viral infections in type 1 diabetes mellitus--why the β cells?. *Nature reviews. Endocrinology*, *12*(5), 263–273.

Richardson, S. J., Willcox, A., Bone, A. J., Foulis, A. K. & Morgan, N. G. (2009). The prevalence of enteroviral capsid protein vp1 immunostaining in pancreatic islets in human type 1 diabetes. *Diabetologia*, 52, 1143–1151

Senís, E., Esgleas, M., Najas, S., Jiménez-Sábado, V., Bertani, C., Giménez-Alejandre, M., Escriche, A., Ruiz-Orera, J., Hergueta-Redondo, M., Jiménez, M., Giralt, A., Nuciforo, P., Albà, M. M., Peinado, H., Del Toro, D., Hove-Madsen, L., Götz, M., & Abad, M. (2021). TUNAR lncRNA Encodes a Microprotein that Regulates Neural Differentiation and Neurite Formation by Modulating Calcium Dynamics. *Frontiers in cell and developmental biology*, *9*, 747667

Szafron, L. M., Balcerak, A., Grzybowska, E. A., Pienkowska-Grela, B., Felisiak-Golabek, A., Podgorska, A., Kulesza, M., Nowak, N., Pomorski, P., Wysocki, J., Rubel, T., Dansonka-Mieszkowska, A., Konopka, B., Lukasik, M., & Kupryjanczyk, J. (2015). The Novel Gene CRNDE Encodes a Nuclear Peptide (CRNDEP) Which Is Overexpressed in Highly Proliferating Tissues. *PloS one*, *10*(5), e0127475

Széll, M., Danis, J., Bata-Csörgő, Z., & Kemény, L. (2016). PRINS, a primate-specific long non-coding RNA, plays a role in the keratinocyte stress response and psoriasis pathogenesis. *Pflugers Archiv : European journal of physiology*, *468*(6), 935–943

Thomaidou, S., Slieker, R. C., van der Slik, A. R., Boom, J., Mulder, F., Munoz-Garcia, A., 't Hart, L. M., Koeleman, B., Carlotti, F., Hoeben, R. C., Roep, B. O., Mei, H., & Zaldumbide, A. (2021). Long RNA Sequencing and Ribosome Profiling of Inflamed β-Cells Reveal an Extensive Translatome Landscape. *Diabetes*, *70*(10), 2299–2312

Todd, J. A., Walker, N. M., Cooper, J. D., Smyth, D. J., Downes, K., Plagnol, V., Bailey, R., Nejentsev, S., Field, S. F., Payne, F., Lowe, C. E., Szeszko, J. S., Hafler, J. P., Zeitels, L., Yang, J. H., Vella, A., Nutland, S., Stevens, H. E., Schuilenburg, H., Coleman, G., … Clayton, D. G. (2007). Robust associations of four new chromosome regions from genome-wide analyses of type 1 diabetes. *Nature genetics*, *39*(7), 857–864

Yeung, W. C., Rawlinson, W. D., & Craig, M. E. (2011). Enterovirus infection and type 1 diabetes mellitus: systematic review and meta-analysis of observational molecular studies. *BMJ (Clinical research ed.)*, *342*, d35

7. Eskerrak eta oharrak

- Lan hau Izortze Santin doktoreak jasotako Eusko Jaurlaritzaren Osasun Sailaren (erreferentzia: 2021111001) eta Espainiako Zientzia eta Berrikuntza Ministerioaren proiektuen (erreferentzia: PID2019-104475GA-I00) bidez finantziatu da.

- Halaber, ni neu Jon Mentxaka jauna, Eusko Jaurlaritzaren Hezkuntza Sailak eskainitako doktore ez diren ikertzaileak prestatzeko Doktoratu Aurreko Programako laguntzaren onuraduna naiz.

Nanoegiturazko biomaterial magnetikoen aplikazioa ehun-ingeniaritzan

Izaro Solozabal[1], Raquel Zurbano[1], Mª Dolores Boyano[2,3], Beatriz Arteta[2], Aitor Benedicto[2], Carolina Redondo[1], Rafael Morales[4,5],

1. Kimika-fisikoa saila. EHU/UPV, Leioa, 48940. 2. Zelulen Biologia eta histologia saila EHU/UPV, Leioa, 48940. 3. Biocruces Health Research Institute, Barakaldo 48903. 4. Kimika-fisikoa saila eta BCMaterials, EHU/UPV, Leioa, 48940. 5. IKERBASQUE, Basque Foundation for Science, Bilbo, 48011.
izaro.solozabal@ehu.eus

Laburpena

Ehun konektiboko zelulak magnetikoki kontrolatzeko ahalmenak aukera berriak sortu ditu medikuntza birsortzailean. Nanopartikula magnetikoak barneratuta dituzten zelulak kanpoko eremu magnetikoen bidez manipula daitezke. Eremu magnetikoek zelulen kanal mekano-sentsitiboak estimulatzen dituzte, eta horiek erantzun biologiko bat aktibatzen dute: ehunen eraketa, zelulen ugalketa eta atxikipena eta zelula-zelula arteko elkarrekintzak, besteak beste. Tesi honen helburua da nanoiman biobateragarrien garapena baliozkotzea kanpoko eremu magnetikoen laguntzaz ehun-birsorkuntza prozesuetan. Horretarako, disko-formako nanoegiturak fabrikatuko dira, orain arte erabili diren nanopartikulen aldean bi ezaugarri bereizgarrirekin: erantzun magnetikoa altuagoa da eta forma-asimetriari esker, torkeak aplikatu ahal izango dira zelulak estimulatzeko. Biomaterial hauen eraginkortasuna zelula endotelialen eta fibroblastoen hazkuntza bidimentsionaletan (2D) eta irla magnetikoak dituzten substratuetan egiaztatukoa da eta esferoideen eraketa duten hazkuntza tridimentsionaletara (3D) heltzea da azken helburua.

Hitz gakoak: ehun-ingeniaritza, lebitazio magnetikoa, nanopartikula magnetikoak, medikuntza birsortzailea, esferoideak

Abstract

The possibility to control remoting magnetically on connective tissue cells has opened up new possibilities in regenerative medicine. Cells that internalise magnetic nanoparticles can be manipulated by external magnetic fields. The action of these fields stimulates mechanosensitive channels, which trigger a biological response that affects proliferation, adhesion and intercellular interaction in tissue formation. The aim of this thesis is to validate the development of new biocompatible nanomaterials that allow effective control of magnetic field-assisted tissue regeneration. To this end, disc-shaped nanostructures will be fabricated with two important distinctive features compared to the nanoparticles that have been used to date: their magnetic moment is much higher and their shape asymmetry will allow torques to be applied as a source of cell stimulation. The efficacy of these biomaterials will be verified in two-dimensional cultures of endothelial cells and fibroblasts on substrates with magnetic island patterns and in three-dimensional cultures with the formation of spheroids.

Keywords: tissue engineering, magnetic levitation, magnetic nanoparticles, regenerative tissue, spheroids

1. Sarrera eta motibazioa

Medikuntza birsortzailea diziplina mediko berria da eta kaltetutako zelulak konpontzea eta ehun berriak garatzea sustatzen du, zelula-terapia eta ehun-ingeniaritzako prozesuen bidez. Zeharkako diziplina bat da, eta haren aurrerapenetatik onura ateratzen dute gaixotasun kardiobaskularren terapiek, hezurretako lesioek, endekapenezko gaixotasun neurologikoek, muskuluak edo tendoiak sendatzeko praktikek edo ebakuntza kirurgikoek, diabetesak edo pazienteen adin aurreratuak prozesu ultzeradun eta orbainetan eragindako konplikazioek.

Zelula amen ezagutzan azken urteetan lortutako aurrerapenak eta ehun-egituraren osagai ezberdinetan bereizteko duten gaitasuna kontuan hartuta, medikuntza birsortzaileak

organismoaren zelulen arteko autokonponketarako teknika oparoak eskaintzen ditu, eta, beraz, gaurkotasun eta interes handiko azterketa-eremu bihurtu da, biztanleriaren osasunean duen eraginagatik (Kharbikar et al., 2022).

Zelulek etengabe behar dute substratu eta seinale-biologikoen elkarrekintza. Seinale horiek zelulak ugaltzea sustatzeaz gain, bideragarritasuna areagotzen dute. Oro har, hazkuntza bidimentsionaleko sistema tradizionalek, non zelulak geruza bakarrean hazten diren, muga batzuei aurre egin behar diete zelula-anitzeko baldintzetan *(in vivo)*. Horrek, besteak beste, zelulen ezaugarriak eta minbizi-zelulak dituzten azterketa zelularrak mugatzen dituzte. Horregatik, hiru dimentsioko zelula-hazkuntza sistemek zelula-mikroingurunearen antzeko baldintzak berrosa ditzakete. Sistema horiek zelula-zelula eta zelula-matrize interakzio-sareak eraikitzen dituzte, eta, horrela, zelula-mekanismoak sakonago ikertu daitezke.

3Dko hazkuntza-ereduak oso interesgarriak dira birsorkuntza-medikuntzan, organismoaren jatorrizko ehunaren antzeko mikroingurunea sortzen dutelako eta zelulen dinamika konplexua modu espezifikoagoan aztertzea ahalbidetzen dutelako. Bi metodologia daude 3D eredu horiek prestatzeko: aldamioak eta esferoideak deritzenak. Aldamioak biomaterial porotsuen egiturak dira, zelulak finkatzeko eta hazteko euskarri gisa balio dutenak. Aldiz, esferoideak zelulen agregazio tridimentsionalak dira, non aldamioaren euskarririk gabe, lekuko ehuna hobeto imitatzen duen zelula-hazkuntza lortzen den. Hazkuntza-eredu hauek lortzeko modu bat zera da: zelula imanduek eta iman iraunkorrek sortutako eremu magnetiko estatikoak erabiltzea. (Kim et al., 2020).

Tesi-proiektu honek lebitazio magnetikoan oinarritutako hazkuntzan enfokatzen du bere ikerketa-ildoa. Teknika horrek zelula indibidualak isolatzea eta, horrela, mekanismo zelularrak eta kanal ionikoen aktibazioa aztertzea ahalbidetzen du (Dobson, 2008). Horrela, zelulen posizioa eta migrazioa kontrola daiteke kanpoko eremu magnetiko bat aplikatuz. Imanek sortutako eremu magnetikoak nanopartikulak barneratuta dituzten zelulak atxikitzen ditu, eta ehunen sorrera erraztu.

Lebitazio magnetikoan oinarritutako azken ikerkuntzek partikula formako imanak erabiltzen dituzte zelulekin kontaktuan. Kanpoko eremu magnetikoaren eraginez, partikula magnetikoak dituzten zelulak grabitatearen aurka lebitatzen dira eta zelula-masaren geometria aldatu egiten da. Izan ere, zelulen arteko interakzioa errazten da eta horrek zelula-agregazioa eragiten du (Tocchio et al., 2018). Eremu magnetikoek nanoegiturak barneratuta dituzten zelulen gain urrutiko kontrola ahalbidetzen dute, zelula eta molekulen arteko interakzioak sortzen baitituzte, eta honek ehunen birsorkuntza edo sendatze-prozesuak erregulatzeko lagundu dezake (Henstock et al., 2018).

Azken hamarkadan, hainbat ikerketak erakutsi dute nanopartikula superparamagnetikoek (NPSP) ahalmen handia dutela teknika horretan. NPSPak burdina (III) oxidoz (Fe_3O_4) osatuak daude. Egoera superparamagnetikoa material ferromagnetiko baten neurriak oso txikiak direnean lortzen da, anisotropia magnetikoa gainditzen da eta materialak ezin du bere une magnetikoaren norabidea egonkor mantendu. Norabide hori etengabe dabil noranzko guztietatik, eta materialaren une magnetikoaren batezbestekoa zero da. Ezaugarri hori funtsezkoa da NPSPen edozein aplikazio biomedikorako; izan ere, zero izango ez balitz, organismoan aglomeratu eta tronboak sortuko lirateke. Hala ere, eremu magnetikoen eraginpean jartzerakoan, une magnetiko bat sortzen da partikuletan, eta horrela lortzen da gure helburua: haiengan urrutitik eragin ahal izatea, hain zuzen (Liu et al., 2020).

Zelulen antolamendua hainbat parametroren menpe dago. Hala nola, eremu magnetiko mota (estatikoa edo alternoa), denbora, uniformea edo gradienteduna, espazioa, intentsitatea, maiztasuna eta, azkenik, partikulen tamaina, forma eta kopurua. Partikula horien erantzun magnetikoak aldaketak eragin ditzake zelulen kanal ionikoetan eta ehunen hazkuntza hobetzen duten ibilbide intra-zelularrak kitzikatu ditzake (Dasari et al., 2022).

2. Arloko egoera eta ikerketaren helburuak

Gaur egun, ehun birsorkuntzako aplikazio preklinikoetan eta klinikoetan egindako aurrerapenak ehunen birsorkuntzan faktore kitzikatzaileak identifikatzetik eta lortzetik datoz nagusiki. Faktore horiek dira kaltetutako ehunaren ingurunea aldatzea eta zelulak eremu horietara mugitzea ahalbidetzen duten faktore kimikoak edo biokimikoak, eta, kaltetutako ehunerako migrazio zelularra eta zelulak leku batean finkatzea ahalbidetzen dute. Estrategia berriak aurkitu dira azken urteotan, besteak beste, metodo fisikoetan oinarritutakoak, hala nola eremu elektrikoak, argiaren esposizioa, beroa, ultrasoinuak eta magnetismoa.

Aukera horien artean, nanopartikula magnetikoetan oinarritutako biomaterialek ikerketa-ildo berri bat zabaldu dute. Ezaugarri nagusi gisa, zera esan genezake: mota horretako materialek aukera ematen dutela kokapen eta mobilizazio espezifiko bat gidatzeko, kanpoko eremu magnetikoen urruneko ekintzaren bidez kontakturik gabeko manipulazio bat egiteko. Horrek aukera ematen du gutxieneko esku-hartze inbaditzaileak diseinatzeko eta aldi baterako modulazio zehatz bat egiteko, kanpoko eremu magnetikoak aktibatuz eta desaktibatuz (Van de Walle et al., 2020).

Orain arte partikula magnetikoekin egindako ehun-ingeniaritzako ikerketa gehienek burdina oxidoz osatutako nanomaterialak erabili dituzte; disko-formako nanoimanek, berriz, %95eko purutasuna dute burdinan. Horren ondorioz, materialaren parametro intrintsekoa, imanazioa (une magnetikoa/bolumena) oxido-partikulena baino lau aldiz handiagoa da. Gainera, partikula superparamagnetikoek 15 nm-tik beherako neurriak izan behar dituzte egoera magnetiko berezi horri eusteko; diskoek, berriz, mikrako tamainak har ditzakete, baita haien konfigurazio-bortizea mantendu ere. Horren ondorioz, diskoen une magnetikoa NPSPena baino milaka aldiz handiagoa da. Horrelako nanoimanekin, eremu magnetikoa aplikatuz ehunak sortzeko egungo erronketako bati aurre egitea da helburua: erantzun magnetiko handiagoa duten biomaterialak lortzea, zelulen manipulazioan eremu magnetikoen intentsitatea murrizteko, eta material-kantitatea minimizatzea, arrisku zitotoxikoak murrizteko.

Ezaugarri hauei esker, kanpoko eremu magnetiko uniformeek torke bat sortzen dute zelulen estimulazio-iturri gisa jarduten duena. Hau da, eremu magnetikoa aplikatzean nanoimanak birarazteko indarrak zelulen atxikipena eta finkapena areagotuko du ehunen eremu kaltetuetan, eta zelulak eremu horietara urrutitik gidatzeko gaitasuna ere.

Beraz, ikerketaren helburu nagusia bortize-egoeran dauden burdinazko nanoimanak fabrikatzea eta karakterizatzea da, disko-formarekin. Horretarako, diametro eta lodiera desberdineko diskoen karakterizazio magnetiko bitartez aplikazio honetarako tamaina egokiena dutenak aukeratuko dira.

Zelula-hazkuntza (zelula endotelialak eta fibroblastoak) probetan efektu toxikorik eragiten ez dutela baieztatuko da; eta gainera, zelulek diskoak barneratzeko behar duten denbora aztertuko da. Horrela, zelula-mota bakoitzerako nanodiskoek zelulen barruan irauten duten denbora aztertuko da, inkubazio-denbora bakoitzerako barneratze-mailarekin lotuz, eta ondorengo azterketetarako nanodiskoen kontzentrazioa, inkubazio-denbora eta zelula barnealdean emandako denbora hoberena aukeratuko dira iraupen luzeko hazkuntza-azterketetarako.

Izan ere, zelulek ibilbide desberdinak erabiltzen dituzte diskoak barneratzeko: fagozitosia, mikropinozitosia eta errezeptoreen bidezko endozitosia, besteak beste. Oro har, fagozitosiak >500 nm tamainako partikulekin gertatzen da; mikropinozitosiaren bidez molekula eta ioiak barneratzen dira; eta, partikula txikiagoak errezeptore bidez barneratzen dira: klatrina edo kabeolina bidez, esaterako (Vercauteren et al., 2010). Mekanismo hauek kontuan izanda, zelulak tamaina desberdineko diskoak barneratzeko zein bide erabiltzen duen aztertzea interesgarria litzateke.

Diskoak urrez estalita dauden arren burdinaren oxidazioa saihesteko eta nanoegituren biobateragarritasuna errazteko, zelula-hazkuntzan nanodiskoen biokonpatibilitatea aztertuko da.

Hazkuntza bidimentsionaletan zelulen proliferazioa aztertzea da helburua, patroi magnetikoak dituzten substratuetan, ea berrantolatzeko gai diren eremu magnetikoak aplikatu ondoren.

Azterketa honek 0.1 Hz eta 10 Hz arteko maiztasuna duten eremu estatikoak edota txandakako eremuak erabiltzea du xedea, parametro horiek erabakigarriak baitira NPSP bidezko erantzun zelularraren ikerketetan.

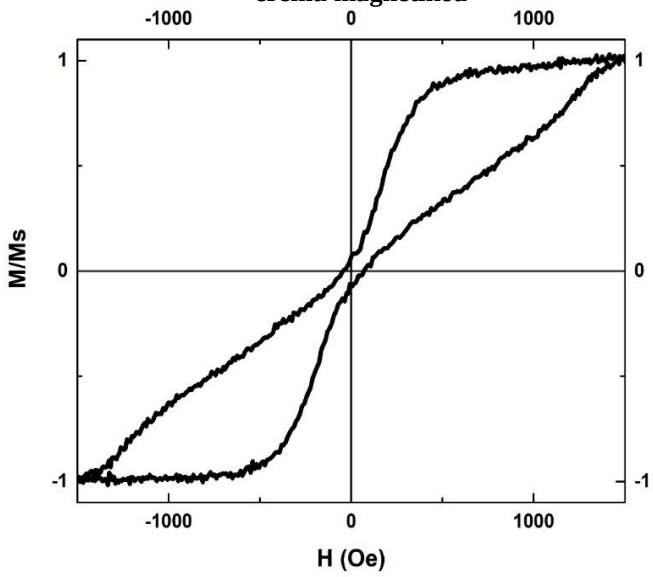
Beraz, zelula endotelialak eta fibroblastoak plaka ez-itsasgarrietan haziko dira eta nanodiskoekin batera inkubatuko dira. Aurretik azaldutako eremu magnetikoaren eraginpean jarriko dira, eta indar magnetikoak gidatutako lebitazioan dauden bi zelula-moten agregazio-dinamika aztertuko da.

Zelula endotelialek ehunen sorreran parte hartzen dute, hori dela eta, ehun ingeniaritzako ikerketan erabiltzen dira. Izan ere, odol-hodiak osatzen dituzte, ehun birsorketan funtsezkoa dena. Hauekin batera, fibroblastoak, ehun konjuntiboko zelularik ohikoenak, ikerketa hauetan erabili ohi izan dira, hainbat egituraren euskarri direlako. Fibroblastoen funtzioa zelulaz kanpoko matrizearen sintesia eta hura mantentzea da, eta zuzenean lotuta dago ehunen orbaintze- eta sendatze-prozesuetan (Shimizu et al., 2022).

3. Ikerketaren muina

Tesi-proiektu honek diziplina anitzeko ikerketa proposatzen du, medikuntza birsortzailean aplikatuko diren biomaterial magnetiko berriak garatzeko. Magnetismoaren (Fisika) eta biologia tisularraren (Medikuntza) arloetako ikerketa taldeen arteko lanak materialen diseinuaren eta zelula-hazkuntzaren arteko etengabeko atzeraelikaduran lagunduko du. Oraindik medikuntzan aztertu ez diren espin-konfigurazioa duten nanoimanak sortuko dira (Irudia 1) eta substratu magnetikoz eta iman iraunkorrez osatutako plataformak diseinatuko dira, 2D eta 3D zelula-hazkuntza azterketak egiteko. Helburu nagusia diseinu horiek optimizatu eta nanoimanen propietate magnetikoak eta zelulen hazkuntza egokitzea da, ehunak sortzeko prozesuetan egungo errendimendua hobetzeko. Funtzio zelularren kontrolak eragin nagusia du aplikazio klinikoetan. Proiektu honetan garatutako biomaterialeekin gaur egun ehun-ingeniaritzan erabiltzen diren materialen muga teknikoak gainditu nahi dira, eremu magnetikoen bidez estimulu fisikoa jarduera biokimiko bihurtzen duten mekano-transdukzio ibilbideak areagotuz.

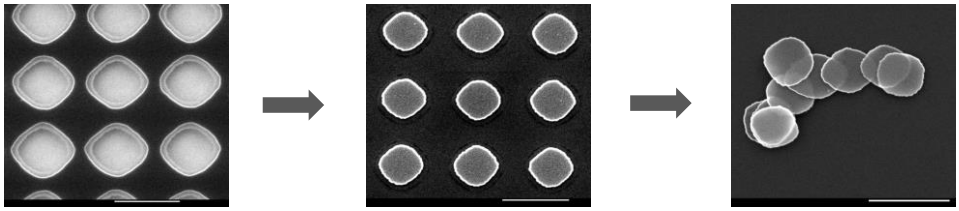
Irudia 1. Bortize- egoeran dagoen burdinazko disko baten histeresi magnetikoa. M/Ms diskoaren imanazio normalizatua da eta H aplikatutako eremu magnetikoa



3.1. Diskoen fabrikazioa

Taldeak esperientzia du litografia-interferentziaren bidez geometria zirkularreko ereduak ekoizteko. Erretxina negatiboetarako esposizio-denborak optimizatuko dira diskoen tamaina bakoitzerako. Karakterizazio morfologikoa ekorketa-mikroskopia elektroniko bidez (SEM) egingo da. *Vibrating Sample Magnetometer* (VSM) magnetometria-neurketekin, espinen konfigurazioa aztertuko da, diskoen bortize-egoera baieztatzeko. Material magnetikoa elektroi bidezko lurrentze bidez jalkiko da. Izan ere, diskoek geruza anitzeko egitura dute; hau da, burdina oxidaziotik babestuko da goiko eta azpiko urre-geruza batekin. Bestalde, substratutik askatzeko, aluminio-geruza bat jarriko da (Irudia 2).

Irudia 2. Fabrikazio-prozesuko etapak: Interferentzia-litografia, elektroi bidezko lurruntzea eta diskoen askapena



3.2. Nanodiskoen barneratze- eta zitotoxikotasun azterketak

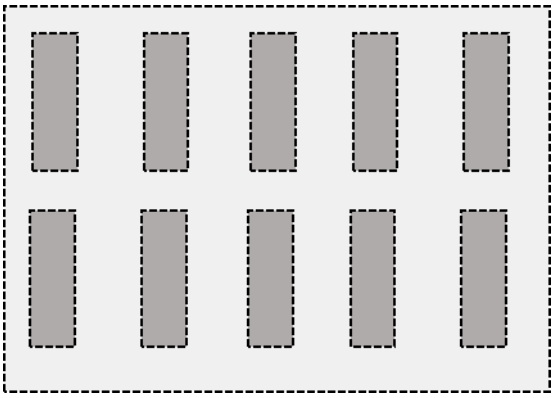
Lehenik eta behin nanodiskoek, nahiz eta urrez estali diren, eragin toxikorik ez dutela sortzen baieztatuko da. Horretarako, nanodiskoak zelula endotelial eta fibroblastoekin haziko dira kontzentrazio eta denbora desberdinetan eta zelulen biziraupena PrestoBlue zundaren bitartez baieztatuko da.

Gainera, barneratze-azterketak egingo dira, zelula mota bakoitzak denbora desberdina behar baitu nanodiskoak barneratzeko. Zelulak barneratutako diskoen kopurua *Super Quantum Interference Device* (SQUID) magnetometria-neurketekin estima daiteke. Horrela, inkubazio-denbora bakoitzerako barneratze-kontzentraziorik altuena aukeratuko da kanpoko eremu magnetikoen aplikazioko entseguetarako.

3.3. 2D zelula-hazkuntza: patroi magnetikoak dituzten substratuak

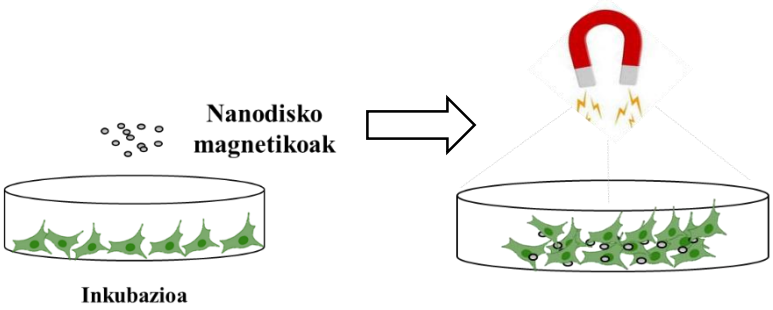
Litografia optiko bidez, laser bidezko idazkera erabilita, irla magnetikoak deritzenak (Irudia 3) sortuko dira. Irla horietan material magnetikoa jalkiko da elektroi bidezko lurruntze bidez eta, ondoren, zelula-hazkuntza aztertuko da substratu hauetan. Hau izango da migrazio zelularra eta zelulen proliferazioa aztertzeko diseinatuko den esperimentua diskoak barneratuta dituzten zelulekin.

Irudia 3. Litografia optiko bidez fabrikatzea espero diren irla magnetikoak



Funtsezkoa izango da zehaztea zenbat denboran aplika daitezkeen kanpoko eremu magnetikoak, zelulen funtzionaltasuna mantenduz. Horretarako, patroi magnetikoak dituzten substratuetan, zelula endotelial eta fibroblastoen hazkuntzetan zelulen bizirautea baieztatuko da, PrestoBlue metodoarekin kanpoko eremu magnetikoa aplikatu ondoren. Horrela, bi zelula-motek 1, 2, 4 eta 8 egunez duten distribuzioa aztertuko da; eremu magnetiko mota eta intentsitatea optimizatu ahal izateko (Irudia 4).

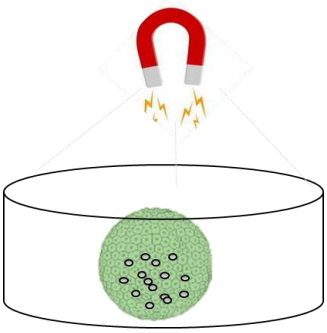
Irudia 4. 2D hazkuntza zelularretarako diseinatutako esperimentua



3.4. 3D zelula-hazkuntza: esferoideak

Zelula endotelialak eta fibroblastoak plaka ez-itsasgarrietan haziko dira nanodiskoekin batera. Aurreko atalean diseinatutako eremu magnetikoaren menpe jarriko dira, eta indar magnetikoak gidatutako lebitazioan dauden bi zelula-moten agregazio-dinamika aztertuko da (Irudia 5). Eremu magnetikoa hazkuntza-denbora desberdinetan aplikatuko da, eta 18-24 orduko inkubazioaren ondoren, esferoideak bildu egingo dira aztertzeko.

Irudia 5. 3D esferoideen formazioa



4. Ondorioak

Proiektu honetan aurkeztu den zelula-funtzioa aktiboki kontrolatzeko mekanismo honek oso ikerketa-tresna erabilgarria eskaintzen du banakako zeluletako, bi dimentsioko hazkuntzako eta hiru dimentsioko ehunetako prozesuen ezagutzan aurrera egiteko, aplikazio biologiko eta klinikoen azken helburuarekin.

Lehenik eta behin, kanpoko eremurik aplikatu gabe, zero imanazioa duten burdinazko nanodiskoak fabrikatuko dira, diametro eta lodiera egokiarekin. Ondoren, nanopartikulek efektu toxikorik ez dutela baieztatu behar da; eta, horrela, patroi magnetikoak dituzten substratuetan zelulen forma eta haien zitoeskeletoaren antolamenduari zuzenean eragitea dugu helburu kanpoko eremu magnetiko bat aplikatuz. Aplikatutako eremu magnetiko uniformeek mugimendu eta migrazioa sortuko dute diskoak barneratu dituzten zelulen gainean. Nanodisko magnetikoak dituzten zelula-hazkuntzetan prozesu biokimikoak, seinaleztapen molekularra eta zelulen adierazpen genetikoa aztertuko dira; zelulen proliferazio-azterketa hori baita esferoideen hazkuntzara salto egiteko pauso erabakigarria.

5. Etorkizunerako planteatzen den norabidea

3D esferoideen hazkuntza ereduek erabilera ugari dituzte: zelulen egitura-funtzio erlazioei buruzko *in vitro* ikerketak egiteko aukera ematen dute eta ingurune organikoko zelula-substantzia edo egituren arteko interakzioari buruzko ikerketetarako tresna egokiak dira. Halaber, hazkuntza-faktoreak, zitokinak, zelulaz kanpoko matrizearen osagaiak eta abar, edo zelulen eta inguruneari buruzko hainbat eragileren arteko erlazioaren analisia egiteko erabili daitezke. 3D hazkuntza-eredu horien erabilerarekin lortutako emaitzei esker estimatu daiteke zein diren zelulak mantentzeko baldintzak, organismo bizian dauden baldintzen oso antzekoak baitira.

Horrela, gaixotasun neurodegeneratiboen edota tumoralen eredu gisa erabili daitezke, izan ere, animali-ereduek ez dituzte gizakiengan dauden ezaugarri adierazgarriak, eta horrek haien aplikagarritasuna mugatzen du. Honekin lotuta gaur egun animali-ereduak erabiltzea murriztu nahi da bioetika dela eta, beraz, esferoideekin lan egiteko aukera biziki haziko da etorkizunean.

Azkenik, zelulen transplante-terapiarako genetikoki eraldatutako esferoideak garatu dira azken urte hauetan. Esferoide horiek suspentsioan prestatzen dira, ondoren pazientearengan injektatzeko. Esferoide horien transplantearen ondoren, aldatutako adierazpen genikoa luzaroago mantentzen da pazientearen ehunetan; aldiz, geruza bakarreko plaken bidez hazitako zelulen adierazpena (2D) murriztu egiten da transplantea egin eta denbora gutxira (Ryu et al., 2019).

6. Erreferentziak

Dasari, A., Xue, J., & Deb, S. (2022). Magnetic Nanoparticles in Bone Tissue Engineering. *Nanomaterials*, *12*(5), 757. https://doi.org/10.3390/nano12050757

Dobson J. (2008). Remote control of cellular behaviour with magnetic nanoparticles. *Nature nanotechnology*, *3*(3), 139–143. https://doi.org/10.1038/nnano.2008.39

Henstock, J. R., Rotherham, M., & El Haj, A. J. (2018). Magnetic ion channel activation of TREK1 in human mesenchymal stem cells using nanoparticles promotes osteogenesis in surrounding cells. *Journal of tissue engineering*, *9*, 2041731418808695. https://doi.org/10.1177/2041731418808695

Kharbikar, B. N., Mohindra, P., & Desai, T. A. (2022). Biomaterials to enhance stem cell transplantation. *Cell stem cell*, *29*(5), 692–721. https://doi.org/10.1016/j.stem.2022.04.002

Kim, S. J., Kim, E. M., Yamamoto, M., Park, H., & Shin, H. (2020). Engineering Multi-Cellular Spheroids for Tissue Engineering and Regenerative Medicine. *Advanced healthcare materials*, e2000608. Advance online publication. https://doi.org/10.1002/adhm.202000608n

Liu, X., Zhang, Y., Wang, Y., Zhu, W., Li, G., Ma, X., Zhang, Y., Chen, S., Tiwari, S., Shi, K., Zhang, S., Fan, H.M., Zhao, Y.X., Liang, X.J. (2020). Comprehensive understanding of magnetic hyperthermia for improving antitumor therapeutic efficacy. *Theranostics*, 10(8), 3793-3815. https://doi.org/10.7150/thno.40805

Ryu, N. E., Lee, S. H., & Park, H. (2019). Spheroid Culture System Methods and Applications for Mesenchymal Stem Cells. *Cells*, *8*(12), 1620. https://doi.org/10.3390/cells8121620

Shimizu, Y., Ntege, E. H., & Sunami, H. (2022). Current regenerative medicine-based approaches for skin regeneration: A review of literature and a report on clinical applications in Japan. *Regenerative Therapy*, *21*, 73-80. https://doi.org/10.1016/j.reth.2022.05.008

Tocchio, A., Durmus, N. G., Sridhar, K., Mani, V., Coskun, B., El Assal, R., & Demirci, U. (2018). Magnetically Guided Self-Assembly and Coding of 3D Living Architectures. *Advanced materials (Deerfield Beach, Fla.)*, *30*(4), 10.1002/adma.201705034. https://doi.org/10.1002/adma.201705034

Van de Walle,A; Perez,J.E.; Abou-Hassan,A.; Hémadi,M.; Luciani,N. and Wilhelm,C.(2020). Magnetic nanoparticles in regenerative medicine: what of their fate and impact in stem cells?,*Materials Today Nano*, Volume 11, 2020, 100084. https://doi.org/10.1016/j.mtnano.2020.100084

Vercauteren, D., Vandenbroucke, R. E., Jones, A. T., Rejman, J., Demeester, J., De Smedt, S. C., Sanders, N. N., & Braeckmans, K. (2010). The use of inhibitors to study endocytic pathways of gene carriers: optimization and pitfalls. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*, *18*(3), 561–569. https://doi.org/10.1038/mt.2009.281

7. Eskerrak eta oharrak

MAGNAMED proiektu europarrari esker lana aurrera eramateko laguntza ekonomikoa jaso dugu.

Izaro Solozabalek Investigo Programaren diru-laguntza jaso du lana burutzeko (27-10-2022 eta 16-04-2023 artean) eta EHUn ikertzaileak prestatzeko kontratazioa jasoko du hurrengo urteetan.

Tse5, bakterioen arteko lehian arrakastarako giltza

Jon Altuna Alvarez[1], Amaia González-Magaña[1], David Albesa-Jové[1]

Biofisika Bizkaia Fundazioa (FBB) eta Biokimika eta Biologia Molekularreko departamentua, Biofisika Institutua (CSIC, UPV/EHU), Euskal herriko Unibertsitatea, Leioa (48940), Espainia.
jon.altunaa@ehu.eus

Laburpena

Bakterioek bere lehiakideetatik libratzeko hainbat mekanismo garatu dituzte, euren artean *Pseudomonas aeruginosa*, erasorako toxina anitzak garatu ditu. Proteina efektoreen artean Tse5 efektorea lehia horretan pieza klabea da. Ikerketa lan honetan Tse5-CT domeinu toxikoaren efektua eta itu zelularra aztertu da. Eskuratutako emaitzek Tse5-CT domeinuak itu zelularen mintzean txertatzeko ahalmena duela deskribatu da. Baita mintzaren despolarizazioa eragiteko kapazitatea duela aurkeztu da.

Hitz-gakoak: *P. aeruginosa*, T6SS, bakterio-efektorea, Tse5, mintzaren despolarizazioa

Abstract

Bacteria have developed several mechanisms to get rid of their competitors, including Pseudomonas aeruginosa, which has developed multiple toxins to attack. Among the effector proteins, the Tse5 effector is a key piece in this competition. In this research work, the effect of the Tse5-CT toxic domain and its cellular fate have been analyzed. The obtained results have described the potential of Tse5-CT domains to insert into the cell membrane. It has also been shown to have the capacity to cause membrane depolarization.

Keywords: P. aeruginosa, T6SS, bacterial effector, Tse5, membrane depolarisation

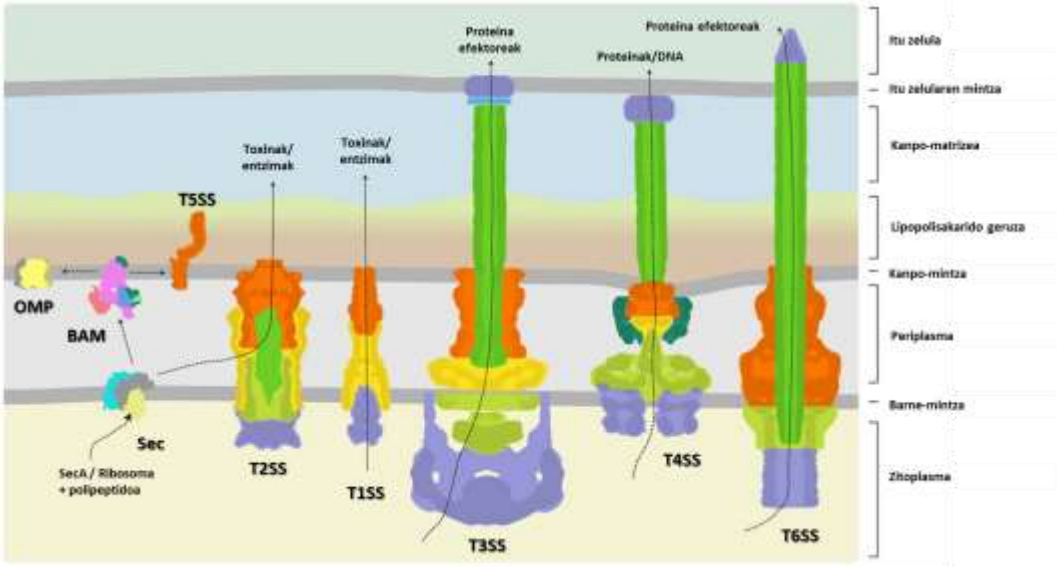
1. Sarrera eta motibazioa

Bakterioak gerra iraunkor batean daude bere inguruneko beste zelulekin, horretarako mekanismo errepertorio zabala garatu dute eboluzioan zehar, bere kolonizazioa eta biziraupena bermatzeko. Beste espezien aurkako borrokarako mekanismoen artean proteinak jariatzeko sistemak daude. Sistema hauek infekzioaren hainbat etapetan funtsezkoak dira, hala nola: toxinen jariapenean, geneen transferentzia-horizontalean eta zelula ostalariaren inbasioan. Orain arte bakterio Gram-negatiboen barnean sei jariatze-sistema mota aurkitu dira, Itik VIra izendatuak (T1SS-T6SS, ingelesezko sigleetatik). Sistema hauek DNA zein proteinak jaria dezakete zelularen kanpo-mediora edota itu zelularen barnera (**1. irudia**).

Prozesu patogenikoetako gogortasuna dela eta, interes handia dago VI. motako jariatze-sisteman (T6SS, *Type VI Secretion System*), batez ere giza bakterio patogenoetan, hala nola: *Vibrio cholerae* (Pukatzki *et al*., 2006), *Salmonella enterica* (Wang *et al*., 2011), *Serratia marcescens* (Murdoch *et al*., 2011) eta, bereziki, *Pseudomonas aeruginosa* (Mougous *et al*., 2006), lan honetako zentroa.

T6SS sistema 2006. urtean aurkitu zen (Mougous *et al*., 2006; Pukatzki *et al*., 2006) xiringa formako nano-erraminta da. Nitxo ekologikoa kontrolatzeko funtsezko pieza gisa nabarmendu zen. Hala, toxinak itu zelularen periplasma edo zitoplasman zuzenean txertatzeko ahalmena du (Cianfanelli *et al*., 2016).

1. irudia. Gram-negatiboen jariapen-sistema nagusien arkitektura (Gunasinghe *et al*., 2017).



P. aeruginosa antibiotikoekiko erresistentzia mekanismo anitzak garatu dituen patogeno Gram-negatiboa da. Hori dela eta, Munduko Osasunaren Erakundeak (MOE) patogenoen aurkako antibiotiko berriak garatzeko lehentasunaren zerrendan bigarren postuan kokatzen du (WHO, 2017). Gizakiengan infekzio oportunistak sortzeko ahalmen handia du; azala, odola, gernu-sistema, entzumen-organo eta arnas bideak infektatuz, azken honetan pneumonia sortuz. *P. aeruginosa* gaixotasun nosokomialen eragile nagusietako bat da, hilgarria izan daiteke zainketa intentsiboetako unitatean (ZIU) ingresatutako paziente, fibrosi kistiko gaixo eta immuno-arriskuan dauden pertsonengan. Infektatzeko gaitasuna bakterio honek duen T6SS sistemarekin lotuta dago, baita honen bidez jariatzen diren efektoreei (Mougous *et al*., 2006).

T6SS honen bidez jariatzen diren efektoreak jarduten duten funtzio toxikoaren eta bere itu zelularraren arabera sailkatzen dira. Orain arte, hurrengo jarduera toxikoa duten efektoreak deskribatu dira:

- **Tse1** eta **Tse3** (Russell *et al*., 2011) bakterioen pareta zelularra degradatzen dituzten efektoreak dira, hauek endopeptidasa (Benz *et al*., 2012; Chou *et al*., 2012) eta muramidasa (Lu *et al*., 2013) funtzioa dute, hurrenez hurren.

- **Tse2** eta **Tse6** $NAD(P)^+$ molekularen degradazioaren bidez itu zelulan efektu bakterioestatikoa kausatzen duten entzimak dira (Robb *et al*., 2016; Whitney *et al*., 2014), $NAD(P)^+$ molekularekin erlazionatuko inhibizioak zelula-orekaren galera sortzen dutelarik.

- **Tse4** mintz-zelularra eraso eta barne-mintzaren ioiekiko iragazkortasuna emendatzen duen proteina poro eragilea da (Whitney *et al*., 2014).

- **Tse7** DNA itu bezala duen endonukleasa entzima da, azido nukleoikoak degradatuz zatiketa zelularra blokeatzen duena (Pissaridou *et al*., 2018; Whitney *et al*., 2014).

- **Tse8** amida taldeak hidrolizatzeko gaitasuna duen entzima da, proteinen sintesiarekin loturiko arazoak sor ditzakeena (González-Magaña *et al*., 2020; Nolan *et al*., 2021).

- **Tse5** 2014. urtean deskribatu zen lehenengo aldiz Alan Filouxen (Hachani *et al*., 2014) eta Joseph Mougousen taldeengatik (Whitney *et al*., 2014). Bi taldeek Tse5 efektorearen jarduera bakteriolotikoa deskribatu zuten, baina honen jarduera molekularra deskribatu gabe gelditu zen. Tse5 pisu molekular handiko toxina da (145 kDa), hiru domeinutan banatzen dena: N-

muturra (Tse5-NT), domeinu zentrala (Tse5-Rhs) eta C-muturra (Tse5-CT). Tse5-CT efektorearen eskualde toxikoa da, hori dela eta lan honen muina bihurtu da.

T6SS jariapen-sistemari asoziatutako efektoreek bakterio-zelula zein zelula-eukariotoen gainean efektu toxikoa dute. Efektu toxikoa efektorea ekoizten duen zeluletan edo ahizpa-zeluletan (espezie berdinekoak diren zelulak) galarazteko immunitate-proteinak garatu dituzte. Immunitate-proteinek efektorea zehazki ezagutzen dute, bere toxikotasuna neutralizatuz.

2. Arloko egoera eta ikerketaren helburuak

P. aeruginosa eragin handiko patogeno oportunista bat da. Efektore kopuru handiak eta haien aniztasun funtzionalak garrantzi handia dute bakterio Gram-negatibo honek eragindako infekzioaren birulentzian. Horregatik, garrantzi handia du *P. aeruginosa*ren efektore ezberdinen ekintza-mekanismoa eta funtzioa ikertzeak eta ulertzeak.

Lan honetan, Tse5 efektorearen domeinu toxikoaren (Tse5-CT) funtzio biologikoa zehaztu nahi dugu, *P. aeruginosa* bakterioaren VI. motako jariatze sistemaren (T6SS) menpeko toxina bat. Gure hipotesi nagusia da Tse5-CT domeinuak bere jarduera toxikoa mintz zitoplasmatikoan egiten duela, bere immunitate-proteina (Tsi5) bakterio Gram-negatiboen barne-mintzean kokatzen dela deskribatu baita (Whitney *et al*., 2014). Horri gehituta Tse5-CT peptido oso hidrofoboa da, mintzean ere sar litekeela iradokitzen duena.

Domeinu toxikoaren funtzio biologikoa eta itu zelularra ikertzeko hainbat helburu eta estrategia desberdin finkatu dira. Lehenik Tse5-CT peptidoaren efektua *Pseudomonas putida* zeluletan deskribatzea da. Baita, domeinu toxikoak permeabilizazio edota despolarizazio efektuak aztertzea da. Azkenik, mintz biologikoetan txertatzeko ahalmena deskribatzea da.

3. Ikerketaren muina

3.1. Tse5-CT domeinuak *P. putida* zeluletan eragin bakteriolitikoa du, Tsi5 immunitate-proteinaren koadierazpenarekin inhibitu daitekeena.

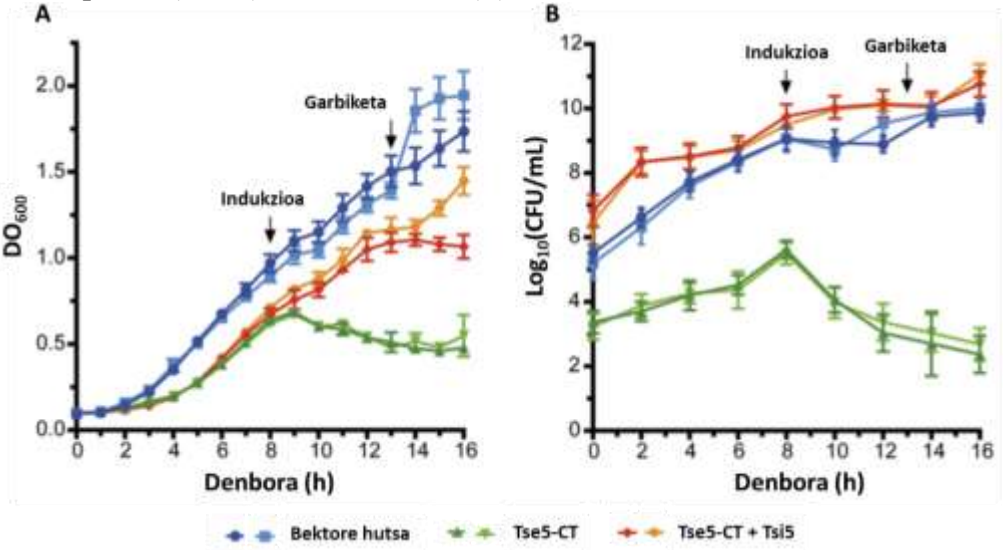
Tse5 efektorearen domeinu toxikoak *P. putida* zelulen gainean duen efektua deskribatzeko zelula-kultiboaren dentsitate optikoa (DO_{600}) eta kolonia sortzaile unitatea mililitroko (CFU/mL) jarraitu da. Teknika honek toxinak bakterioen gainean efektu bakteriolitikoa (zelulen apurtzea) edo bakteriostatikoa (zelula zatiketaren inhibizioa) desberdintzeko aukera ematen digu.

Entsegu honetan *P. putida* zelulak Tse5-CT kodifikatzen duten plasmidoekin transformatu dira, baita inolako proteinarik adierazten ez duten plasmidoekin, kontrol negatibo bezala. Bestaldetik, Tsi5 immunitate-proteina adierazten duten plasmidoekin kotransformatu dira, efektorearen toxikotasuna inhibitzeko gaitasuna ikertzeko erabili dira.

2A. irudian adierazi bezala, Tse5-CT ekoizten duten zeluletan (berdea) zelula-kultiboaren dentsitate-optikoa murrizten da, Tse5-CT toxikoa dela bermatuz. Bestetik, inolako proteina kodifikatzen ez duten plasmidoekin transformatutako zelula-kultiboen (urdina) dentsitate-optikoa areagotu egiten da, inolako efektu toxikorik erakutsi gabe. Azkenik, Tse5-CT eta Tsi5 adierazten duten plasmidoak dituzten zelula-kultiboetan (gorri-laranja) ikusi daiteke toxina eta immunitate-proteina koadieraztean dentsitate-optikoa areagotu egiten da, immunitate-proteinak toxinaren efektua blokeatzeko gai dela berretsiz.

2B. irudian emaitza berdinak lortzen ditugu, kolonia sortzaile unitatea aztertuz Tse5-CT (berdea) proteinaren efektu toxiko berdina deskribatzen da, zelula-kultiboan dagoen kolonia sortzaile unitatea txikiagotzen baita toxina adierazi orduko. Tse5-CT toxinak *P.putida* zelulen gainean efektu bakteriolitikoa duela konfirmatuz. Baita immunitate-proteinaren presentzian efektu toxikoa neutralizatzen dela (gorri-laranja), kolonia sortzaile unitatea areagotzen baita.

2. irudia. **Tse5-CT-aren adierazpenak eragindako efektu biologikoa *P. putida* zeluletan. (A) Dentsitate-optikoa (DO_{600}) denborarekiko. (B) Kolonia sortzaile unitatea denborarekiko.**



3.2. Tse5-CT toxinak *P. putida* zelulen despolarizazioa eragiten du, Tsi5 peptidoaren bidez blokeatu daitekeena.

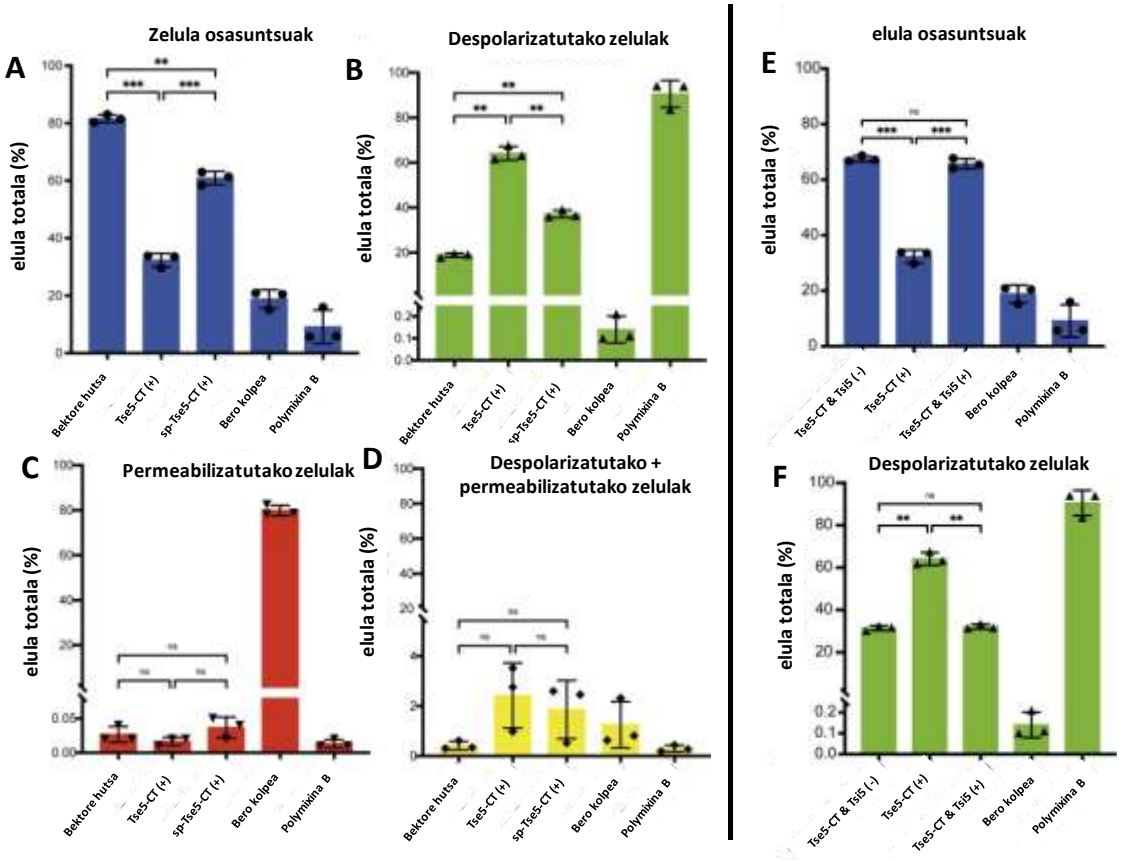
Tse5-CT toxinak *P. putida* zelulen mintza permeabilizatzeko edota despolarizatzeko ahalmena aztertu da. Horretarako, bi sonda fluoreszenteen seinalea neurtu da. SytoxTM Deep Red (permeabilizazioa) DNA molekuletara batzen den sonda gorria da, mintza zeharkatzeko ahalmena ez duena. Beraz, zelula osasuntsuetan; hau da, mintzaren integritatea mantentzen dutenak, ez ditu markatuko, bai honen mintzean poroak sortu diren zeluletan. Bestetik, $DiBAC_4(3)$ (despolarizazioa) zitoplasmako proteinak batzen dituen sonda anioniko berdea da. Zelula osasuntsuetan zitoplasmak karga neto negatiboa du, beraz, aldarapen elektrostatikoaren eraginagatik ez ditu zelulak markatuko, baina mintz-potentzialaren asaldurak gertatzen direnean zelulak markatuko ditu. Bero kolpea eta polimixina B kontrol positibo bezala erabili dira, SytoxTM Deep Red (permeabilizazioa) eta $DiBAC_4(3)$ (despolarizazioa) sondak ongi funtzionatzen dutela bermatzeko.

Tse5-CT toxinaren bi aldaera erabili dira, bata basatia eta bestea peptido-seinale bat gehitu zaio, periplasmara translokatua izateko. Hau, toxina zitoplasman edo periplasman efektu toxikoa ote duen deskribatzeko erabili da.

3. irudian azaltzen den bezala Tse5-CT toxinaren adierazpenak zelula osasuntsuen kopurua bortizki murrizten du, **3A irudian** aurkeztuta. Aldi berean, Tse5-CT peptidoaren adierazpenak despolarizatutako zelulen kopurua sendoki areagotzen du, **2B irudia**. Permeabilizatutako eta permeabilizatutako + despolarizatutako zelula kopuruetan ez da inolako aldaketarik nabarmentzen, **3C eta 3D irudiak**.

Immunitate-proteina adierazi diren kasuetan ikusi daiteke zelula osasuntsuen kopurua berreskuratu daitekeela, **3E. irudia**. Aldi berean despolarizatutako zelulen kopurua murrizten da, **3F. irudia**. Beraz, immunitate-proteinak toxinaren efektua neutralizatu dezake, modu honetan toxina ekoizten duen zelula babesten da.

3. irudia. Tse5-CT eta Tsi5 proteinen adierazpenak eragindako efektua *P. putida* zeluletan. (A, E) zelula osasuntsuak. (B, F) despolarizatutako zelulak. (C) permeabilizatutako zelulak. (D) despolarizatutako eta permeabilizatutako zelulak.



3.3. Tse5-CT domeinuak itu zelulen mintz biologikoetan txertatzeko gaitasuna du.

Mintz zeharkako domeinuak nabarmenki aminoazido hidrofobikoz osotutako eta mintza zeharkatzen duten motiboak dira. Sekuentzia hauek aurkitzeko, algoritmo sinplea erabilita Tse5-CT sekuentziaren aminoazido bakoitzeko joera hidrofobikoa aztertu da (Jones, 2007). Datu hauek kontuan hartuta bost mutante diseinatu dira (K1229, A1269, A1281, K1300 eta Q1317, aminoazido zenbakia erreportari duala non fusionatu den adierazten du, **4A. eta 4B. irudietan** adierazita.

Behinik zonalde hidrofobikoak definituagoak genituenean PhoA-LacZα erreportari duala erabili zen. Mekanismo honen bidez mutante ezberdinen C-muturra zitoplasman edo periplasman aurkitzen ote den ezagutuko dugu (Karimova *et al*., 2009). Erreportari dual hau bi proteinen arteko fusio estrategikoa da. Alde batetik, fosfatasa alkalinoak (PhoA) bakarrik periplasman aurkitzen denean seinalea emango du, bertan medio oxidatiboak disulfuro zubien sortzea faboratuko du, PhoA entzima gai delarik X-Pho (edo *p*-NPP) konposatua degradatzeko, koloniei kolore urdina emanik. Bestetik, β-galaktosidasaren α-peptidoak (LacZα) zitoplasman funtzionatuko du, bertan genomikoki ekoizten den β-galaktosidasaren ω-peptidorekin (LacZω) batuko da, β-galaktosidasa funtzionala ekoitziz, kasu honetan Red-Gal (edo ONPG) konposatua degradatuko du, koloniari kolore gorria emanik. Hurbilketa esperimental hau *in vivo* zein *in vitro* jarraitu daiteke, lehenengo kasuan agar plaka baten kolonien kolorea aztertze da, bigarren kasuan aldiz, mutante bakoitzeko aktibitate-entzimatiko normalizatua (AEN) jarraitzen da (**1. formula**). Esperimentuak *E. coli* DH5α zelula anduian burutu izan dira.

1. formula. PhoA-LacZα mutanteen aktibitate-entzimatiko normalizatua (AEN).

$$A = 1000 \cdot (DO_{405} lagina - DO_{405} kontrola)/(DO_{600} lagina - DO_{600} kontrola) \cdot t(min)^{-1}$$

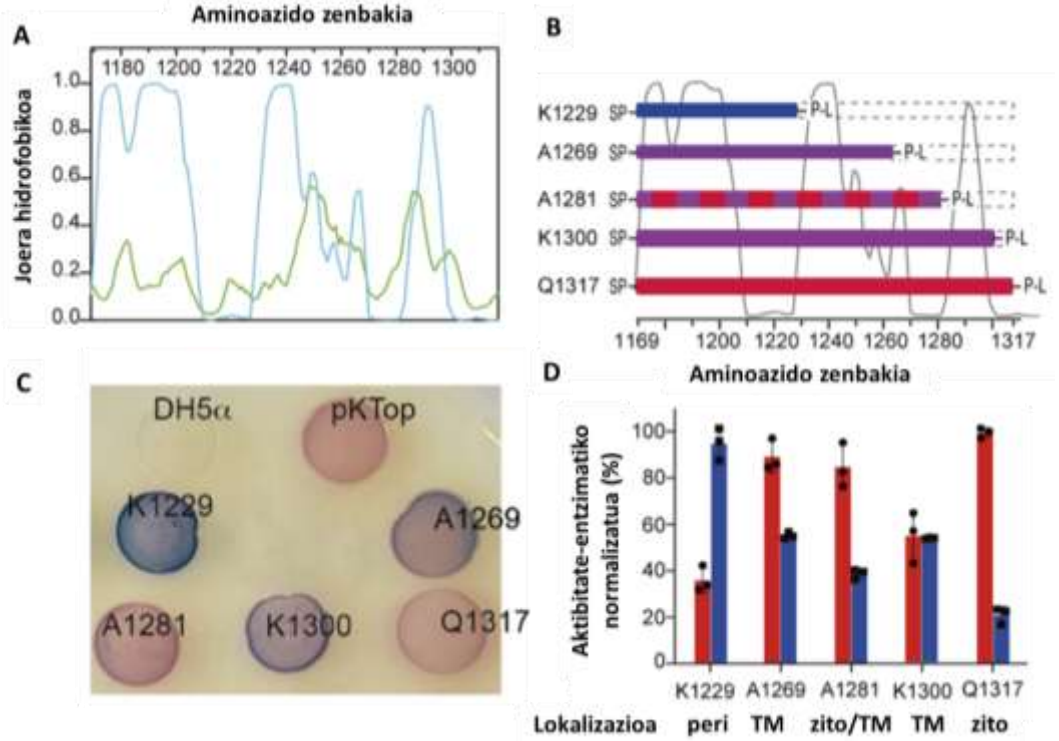
4C. irudian *E. coli* DH5α zelulak mutante ezberdinekin transformatuak izan direnak, agar plaka baten erein dira, plaka honetan konposatu kromogenoak dituelarik. K1229 mutanteak

kolore urdineko koloniak sortzen ditu, C-muturra periplasman dagoela konfirmatuz. Kontrako aldean, Q1317 mutantea, Tse5-CT osoa adierazten duena, kolore gorriko koloniak sortzen ditu, C-muturra zitoplasman dagoelarik. Bi hauen artean aurkitzen diren beste mutanteak, kolore morea aurkezteen dute, kasu honetan mutantea mintz zeharkako domeinu baten moztu izan delako, eta horregatik C-muturra zitoplasman, zein periplasman aurkitu dezakegu, kolore gorria eta urdina ematen duten konposatu kromogenoen koloreak batzen baitira (gorria + urdina = morea).

Kontrol negatibo bezala *E. coli* DH5α zelulak erabili dira, PhoA-LacZα entzimen gabeziagatik kolore zuria dute. Eta kontrol positibo bezala pKTop plasmido basatiarekin transformatutako *E. coli* DH5α zelulak, LacZ entzimaren aktibitatea bakarrik ikusi daiteke.

4D. irudian K1229 eta Q1317 mutanteak muturretako kasuak dira, lehengoa periplasman kokatzen da, eta bigarrena zitoplasman. Muturretako kasu hauek gertatzeko bi puntu hauen artean gutxienez mintz zeharkako domeinu bat aurkitu behar da. Hau berretsi egiten da bi mutante hauen artean dauden beste mutanteetan lortutako emaitzekin, hauen aktibitate-entzimatiko normalizatua mugan aurkitzen baita, mintz zeharkako domeinu baten parte bezala deskribatuz.

4. irudia. **(A) Domeinu toxikoaren aminoazido bakoitzeko joera hidrofobikoa. (B) Diseinatutako mutante ezberdinak. (C) *In vivo* agar plakako emaitzak. (D) *In vitro* PhoA-LacZα sistemarekin aktibitate-entzimatiko normalizatua eta mutante bakoitzeko lokalizazioa** zito: zitoplasma (gorria), peri: periplasma (urdina) eta TM: transmintz (morea).



4. Ondorioak

Eskuratutako emaitzei esker badakigu Tse5 efektorearen domeinu toxikoak (Tse5-CT) *P. putida* zeluletan adierazten denean efektu bakteriolitikoa duela, Tsi5 immunitate-proteinaren koadierazpenaren bidez alderantzikatu daitekeena. Bestetik, mintz-potentziala deuseztatzeko (zelulak despolarizatzeko) gaitasuna du, mintz plasmatikoaren iragazkortasuna konprometitu gabe (zelulak permeabilizatu gabe), hau ere Tsi5 proteinaren adierazpenarekin blokeatu daiteke. Azkenik, Tse5-CT domeinua kapaza da mintz biologikoetan txertatzeko, gutxienez mintz zeharkako domeinu bat deskribatu baitugu.

5. Etorkizunerako planteatzen den norabidea

Ikerketa honetan lortutako emaitzek Tse5 proteinaren ekintza-mekanismoaren lehen froga esperimentala eskaintzen dute. Emaitza hauek bereziki esanguratsuak dira Tse5 efektorearen jarduera bakteriolitikoa eta *P. aeruginosa* patogenoaren garrantzi biomedikoa kontuan hartuta.

Etorkizunera begira, orain arte ikertu ez diren edo bere funtzioa ezezaguna den toxinak hobeto ezagutzean lagundu dezake. Gainera, gure aurkikuntzek Tse5-CT domeinua imitatzen duten peptido antimikrobianoak garatzeko estrategian lagun dezakete.

6. Erreferentziak

Benz, J., Sendlmeier, C., Barends, T. R. M., & Meinhart, A. (2012). Structural insights into the effector - immunity system Tse1/Tsi1 from Pseudomonas aeruginosa. *PLoS ONE*, *7*(7). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0040453

Chou, S., Bui, N. K., Russell, A. B., Lexa, K. W., Gardiner, T. E., LeRoux, M., Vollmer, W., & Mougous, J. D. (2012). Structure of a Peptidoglycan Amidase Effector Targeted to Gram-Negative Bacteria by the Type VI Secretion System. *Cell Reports*, *1*(6), 656–664. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2012.05.016

Cianfanelli, F. R., Monlezun, L., & Coulthurst, S. J. (2016). Aim, Load, Fire: The Type VI Secretion System, a Bacterial Nanoweapon. In *Trends in Microbiology* (Vol. 24, Issue 1, pp. 51–62). https://doi.org/10.1016/j.tim.2015.10.005

González-Magaña, A., Altuna, J., Queralt-Martín, M., Largo, E., Velázquez, C., Montánchez, I., Bernal, P., Alcaraz, A., & Albesa-Jové, D. (2022). The P. aeruginosa effector Tse5 forms membrane pores disrupting the membrane potential of intoxicated bacteria. *Communications Biology*, *5*(1), 1189. https://doi.org/10.1038/s42003-022-04140-y

González-Magaña, A., Sainz-Polo, M. Á., Pretre, G., Çapuni, R., Lucas, M., Altuna, J., Montánchez, I., Fucini, P., & Albesa-Jové, D. (2020). Structural insights into Pseudomonas aeruginosaType six secretion system exported effector 8. *Journal of Structural Biology*, *212*(3), 107651. https://doi.org/10.1016/j.jsb.2020.107651

Gunasinghe, S. D., Webb, C. T., Elgass, K. D., Hay, I. D., & Lithgow, T. (2017). Super-resolution imaging of protein secretion systems and the cell surface of gram-negative bacteria. In *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* (Vol. 7, Issue MAY). https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00220

Hachani, A., Allsopp, L. P., Oduko, Y., & Filloux, A. (2014). The VgrG proteins are "à la carte" delivery systems for bacterial type VI effectors. *Journal of Biological Chemistry*, *289*(25), 17872–17884. https://doi.org/10.1074/jbc.M114.563429

Jones, D. T. (2007). Improving the accuracy of transmembrane protein topology prediction using evolutionary information. *Bioinformatics*, *23*(5), 538–544. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btl677

Karimova, G., Robichon, C., & Ladant, D. (2009). Characterization of YmgF, a 72-residue inner membrane protein that associates with the Escherichia coli cell division machinery. *Journal of Bacteriology*, *91*(1), 333–346. https://doi.org/10.1128/JB.00331-08

Lu, D., Shang, G., Yu, Q., Zhang, H., Zhao, Y., Cang, H., Gu, L., Xu, S., & Huang, Y. (2013). Expression, purification and preliminary crystallographic analysis of the T6SS effector protein Tse3 from Pseudomonas aeruginosa. *Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications*, *69*(5), 524–527. https://doi.org/10.1107/S1744309113007148

Mougous, J. D., Cuff, M. E., Raunser, S., Shen, A., Zhou, M., Gifford, C. A., Goodman, A. L., Joachimiak, G., Ordoñez, C. L., Lory, S., Walz, T., Joachimiak, A., & Mekalanos, J. J. (2006). A virulence locus of Pseudomonas aeruginosa encodes a protein secretion apparatus. *Science*, *312*(5779), 1526–1530. https://doi.org/10.1126/science.1128393

Murdoch, S. L., Trunk, K., English, G., Fritsch, M. J., Pourkarimi, E., & Coulthurst, S. J. (2011). The opportunistic pathogen Serratia marcescens utilizes type VI secretion to target bacterial competitors. *Journal of Bacteriology*, *193*(21), 6057–6069. https://doi.org/10.1128/JB.05671-11

Nolan, L. M., Cain, A. K., Clamens, T., Furniss, R. C. D., Manoli, E., Sainz-Polo, M. A., Dougan, G., Albesa-Jové, D., Parkhill, J., Mavridou, D. A. I., & Filloux, A. (2021). Identification of Tse8 as a Type VI secretion system toxin from Pseudomonas aeruginosa that targets the bacterial transamidosome to inhibit protein synthesis in prey cells. *Nature Microbiology*, *6*(9), 1199–1210. https://doi.org/10.1038/s41564-021-00950-8

Pissaridou, P., Allsopp, L. P., Wettstadt, S., Howard, S. A., Mavridou, D. A. I., & Filloux, A. (2018). The Pseudomonas aeruginosa T6SS-VgrG1b spike is topped by a PAAR protein eliciting DNA damage to bacterial competitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *115*(49), 12519–12524. https://doi.org/10.1073/pnas.1814181115

Pukatzki, S., Ma, A. T., Sturtevant, D., Krastins, B., Sarracino, D., Nelson, W. C., Heidelberg, J. F., & Mekalanos, J. J. (2006). Identification of a conserved bacterial protein secretion system in Vibrio cholerae using the Dictyostelium host model system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *103*(5), 1528–1533. https://doi.org/10.1073/pnas.0510322103

Robb, C. S., Robb, M., Nano, F. E., & Boraston, A. B. (2016). The Structure of the Toxin and Type Six Secretion System Substrate Tse2 in Complex with Its Immunity Protein. *Structure*, *24*(2), 277–284. https://doi.org/10.1016/j.str.2015.11.012

Russell, A. B., Hood, R. D., Bui, N. K., Leroux, M., Vollmer, W., & Mougous, J. D. (2011). Type VI secretion delivers bacteriolytic effectors to target cells. *Nature*, *475*(7356), 343–349. https://doi.org/10.1038/nature10244

Wang, M., Luo, Z., Du, H., Xu, S., Ni, B., Zhang, H., Sheng, X., Xu, H., & Huang, X. (2011). Molecular characterization of a functional type VI secretion system in Salmonella enterica serovar Typhi. *Current Microbiology*, *63*(1), 22–31. https://doi.org/10.1007/s00284-011-9935-z

Whitney, J. C., Beck, C. M., Goo, Y. A., Russell, A. B., Harding, B. N., de Leon, J. A., Cunningham, D. A., Tran, B. Q., Low, D. A., Goodlett, D. R., Hayes, C. S., & Mougous, J. D. (2014). Genetically distinct pathways guide effector export through the type VI secretion system. *Molecular Microbiology*, *92*(3), 529–542. https://doi.org/10.1111/mmi.12571

WHO. (2017). Prioritization of pathogens to guide discovery, research and development of new antibiotics for drug resistant bacterial infections, including tuberculosis. In *Essential medicines and health products*.

7. Eskerrak eta oharrak

Artikulua hau master amaierako lanetik eta publikatutako artikulutik (González-Magaña *et al*., 2022) eratorria eta moldatua dago. Artikulu hau Jon Altuna ikasleari esleitutako UPV/EHUren Doktorego Tesirako beka bati esker eta David Albesak jasotako Espainiako Ekonomia eta Lehiakortasun Ministerioko eta Eusko Jaurlaritzako diru-laguntzei esker idatzi da. Eskerrak eman nahi dizkiot Amaia González-Magaña teknika esperimental guztiak irakasteagatik; David Albesa-Jovéri, ideia planteatu eta zuzentzeagatik; Euskal Herriko Unibertsitateari eta Biofisika Institutuari esperimentuak egiteko beharrezko baliabideak eskaintzeagatik.

Hiri-lurzoruetako metalen eta metaloideen edukiaren eta bioeskuragarritasunaren ebaluazioa

Ainhoa Lekuona Orkaizagirre[1], Ainara Gredilla Altonaga[2], Maite Meaurio Arrate[1], Eneko Madrazo Uribeetxebarria[3], Maddi Garmendia Antin[3],
[1]*Kimika Aplikatua Saila, Kimika Fakultatea, UPV/EHU,*
[2]*Kimika Analitikoa Saila, Zientzia eta Teknologia Fakultatea, UPV/EHU,*
[3]*Ingeniaritza Energetikoa Saila, Gipuzkoako Ingeniaritza Eskola, UPV/EHU*
ainhoa.lekuona@ehu.eus

Laburpena

Hirietako lurzoruek zenbait metal izan ditzakete, horietatik batzuk toxikoak direlarik. Metalak eta metaloideak giza-gorputzean sar daitezke, inhalazio, ingestio edo azaleko absortzioaren bidez. Kontuan izanda 1 eta 12 urte bitarteko haurren eguneko batezbesteko ingestio-dosia 200 mg·egun^{-1} dela, digestio prozesuaren bidez lurzorutik barneratu daitezkeen metalak determinatzeko in vitro metodologia desberdinak proposatu dira. SBET (*Simplified Bioaccessibility Extraction Test*) metodoak giza-urdaileko baldintzak simulatzen ditu. Ikerketa honetan 27 lurzoru-lagin bildu dira Donostiako aisialdi-guneetan, metal eta metaloideen (Fe, Ni, Zn, As, Cr, Cd eta Pb) bioeskuragarritasuna ebaluatzeko.

Aztertutako elementu guztien kontzentrazioa Lurzoruen Legeko (4/2015) Ebaluazio Balio Adierazgarrien (B-EBA) azpitik agon arren, SBET metodoak Zn, Pb eta Cd metal bioeskuragarrienak bezala identifikatzea ahalbidetu du.

Hitz gakoak: lurzoruak, metalak eta metaloideak, bioeskuragarritasuna, SBET

Abstract

Urban soils may contain different metals, some of them being toxic. Metals and metalloids can enter the human body by direct inhalation, ingestion or dermic absorption. Taking into account that 200 mg·day^{-1} is the average daily ingested dose of soil for children aged from 1 to 12, in vitro methodologies have been proposed for the quantification of the metal fraction mobilized from soils during the digestion process. SBET (Simplified Bioaccessibility Extraction Test) method simulates the human gastric conditions. A total of 27 urban soils were collected in leisure areas from San Sebastian to evaluate the bioaccessibility of metals and metalloids (Fe, Ni, Zn, As, Cr, Cd and Pb).

Although the concentration of the examined metals is below the Indicative Evaluation Value (B-EBA) defined in the Soils Law (4/2015), the SBET method has provided the identification of Zn, Pb and Cd as the most bioaccessible metals.

Keywords: soils, metals and metalloids, bioaccessibility, SBET

1. Sarrera eta motibazioa

Lurzorua lurrazalaren gainazaleko geruza gisa definitzen da eta mineral-partikulak, materia organikoa, ura, airea eta organismo bizidunak dira bere osagai nagusiak. Oso dinamikoa da eta funtzio asko ditu: karbonoaren eta biomasaren ekoizle nagusia da eta biodibertsitatearen garapena eta ekosistemaren biziraupena ahalbidetzen ditu, besteak beste. Hori dela eta, lurzorua ezinbestekoa da gizakiarentzat eta bere osasunarentzat, eta beraz garrantzitsua da lurzoruaren kalitatea bermatzea (Petruzzelli et al., 2020).

Hiriguneetako lurzoruetan toxikotasun ezberdineko metalak aurki daitezke, oro har, traza-elementu gisa, 100 mg·kg^{-1} baino kontzentrazio txikiagoan, eta horiek giza gorputzean sar daitezke, inhalazio zuzenaren, ingestioaren eta kontaktu dermikoaren bidezko absortzioaren bidez (Ferreira-Baptista eta De Miguel, 2005; Poggio et al., 2008). Estatu Batuetako Ingurumen Babesaren Agentziaren arabera (ingelesez *United States Environmental Protection Agency*, USEPA), honakoak dira lurzoru eta sedimentuen eguneko ingestio-balioak: 1 eta 12 urte bitarteko haurren kasuan 200 mg·egun^{-1} eta 12 urtetik aurrerako pertsonentzat 100 mg·egun^{-1} (USEPA, 2011). Haurren kasuan, lur- eta sedimentu-partikulen ingestioa bide ohikoa da traza-elementuak

organismoan sartzeko, uraren edo metal astunekin kutsatutako elikagaien ingestioa bezain esposizio-bide garrantzitsua izanik. Haurren nerbio-sistema garatzear dagoela eta gorputz tamaina txikia dutela kontuan izanik, haiengan elementu horien eragina handiagoa da.

Oro har, lurzorua kutsatuta dagoela determinatzeko, Lurzoruen Legeko (4/2015) Ebaluazio Balio Adierazgarriak (EBA balioak) erabiltzen dira erreferentzia gisa. Legean definitutako EBA balioen artean, pertsonen babeserako definitutako B-EBA balioak izan dira lan honetan erreferentzia moduan hartu direnak. Balio horiek honako eremu-moten araberakoak dira: haurren jolaserako eremua, hiria, parke publikoa, industria eta beste erabilera batzuk. Horrez gain, arestian aipatutakoa kontuan izanik, elementu horiek giza gorputzean izan dezaketen eragina ebaluatzeko garrantzitsua da giza gorputzak absorbatzeko eskuragarri dagoen frakzioa, hots, frakzio bioeskuragarria, determinatzea.

2. Arloko egoera eta ikerketaren helburuak

Gaur egun, bioeskuragarritasuna ebaluatzeko tekniken artean, in vivo zein in vitro metodoak erabiltzen dira. In vivo esperimentuak anatomikoki, metabolikoki eta fisiologikoki gizakien antzekoak diren animaliekin egiten dira (Turner, 2011). In vitro metodoak, bestetik, aukera etikoago eta merkeago gisa aurkezten dira, non giza-digestioa simulatzen den giza-gorputzean oinarritutako fluido sintetikoak erabiliz. Horrela, saiakuntza horien bidez urdailean zein hesteetan disolbagarria den eta beraz absortziorako eskuragarri dagoen kutsagai baten frakzioa neurtu daiteke, hau da, bioeskuragarria den frakzioa.

Oinarri fisiologikoan oinarritutako erauzketa proba (PBET, *Physiologically Based Extraction Test*) eta bioeskuragarritasun-erauzketa proba sinplifikatua (SBET, *Simplified Bioaccessibility Extraction Test*) gehien erabiltzen diren bi metodo dira digestio biokimikoa giza traktu gastrointestinalean simulatzeko. SBET, PBETaren forma sinplifikatu gisa definitzen da, eta urrats bakarreko erauzketa da, urdaileko baldintzak bakarrik simulatzen dituelarik.

Aukeratutako in vitro metodoa edozein izanda ere, elementuek bioeskuragarritasun balio desberdinak izaten dituzte, besteak beste, honako faktoreen ondorioz: jatorrizko forma kimikoa, pH-a, erauzketako portaera eta lurraren edo sedimentuaren buztin-edukia (Ljung et al., 2007).

Ikerketa honen xede nagusia hiri-lurzoruetako zenbait metal eta metaloideen edukia aztertzea eta horien bioeskuragarritasuna ebaluatzea izan da, horretarako SBET in vitro metodo sinplifikatua erabiliz. Helburu hori lortzeko, honako helburu txikiagoak definitu dira:

- Lurzoruaren kalitatea aztertzea, Fe, Ni, Zn, As, Cr, Cd eta Pb edukiaren balioak Lurzoruen Legeko B-EBA balioekin alderatuz.
- Metalen edukiari dagokionez kokapen geografikoaren araberako joera orokorrik antzematen den ondorioztatzea.
- Lurzoruaren parametro fisiko-kimikoen eta aztertutako metalen edukiaren arteko erlazioa ebaluatzea.
- Aztertutako metalen eta metaloideen artean irisgarritasun handienekoak zeintzuk diren identifikatzea eta kuantifikatzea, lurzoru bakoitzeko metal edukia eta bioeskuragarria den frakzioa alderatuz.

3. Ikerketaren muina

3.1. Laginketa

Laginketa-gunea Donostian kokatzen da, Gipuzkoako hiriburuan, hain zuzen. Kantauri itsasoko kostaldean kokatzen da eta bertako klima ozeaniko epela da, honako bereizgarriak dituelarik:

tenperatura apalak, hezetasun erlatibo altuak, hodeitza sarriak eta urtean zehar erregulartasunez banatutako euria (Bueno, 2017).

Guztira 27 lurzoru-lagin hartu dira hirian zehar, gehienak haurren parkeetatik edo aisialdirako guneetatik. Laginak inguru ezberdinetatik hartu dira: kostatik gertu, hiriaren erdigunean, industria-guneetatik gertu, mendialdetik hurbilago, etab. 1. irudian laginketa-mapa ikus daiteke, laginketa-puntuekin.

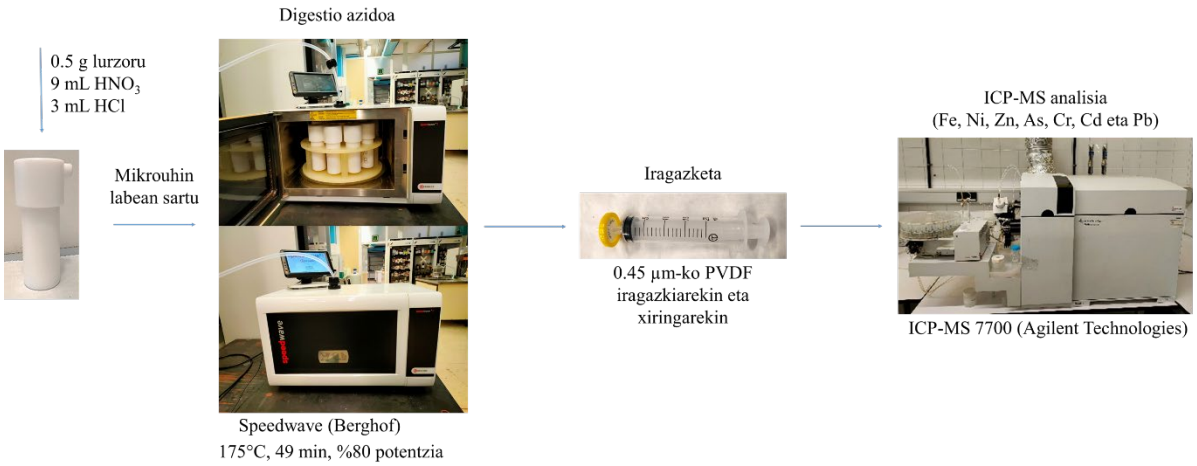
1. irudia. Laginketa-puntuak mapan.

3.2. Prozedura esperimentala

Lurzoruaren parametro fisiko-kimikoek metalen fase-banaketan eta beraz haien bioeskuragarritasunean izan dezaketen eragina aztertu ahal izateko, honakoak neurtu dira: pH-a, eroankortasun elektrikoa eta karbonatoen zein materia organikoaren edukia. pH-a eta eroankortasun elektrikoa elektrodoen bidez neurtu dira, 5 g lurzoruri 25 mL ur gehitu eta denbora batez irabiatu ondoren; karbonatoak atzerako balorazio bidez eta materia organikoa *Lost On Ignition* (LOI) bezala ezagutzen den kaltzinazio-teknikaren bidez (TC WI, 2003).

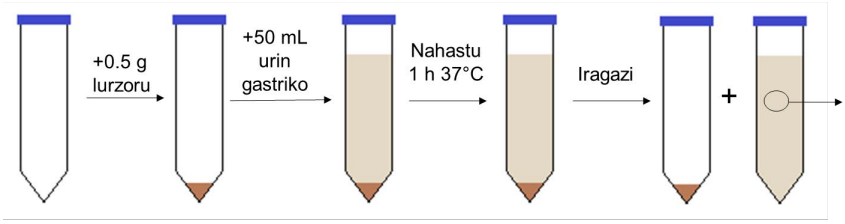
Ondoren, lurzoruetako metal eduki *pseudo*totala determinatu da, *agua regia* (HNO_3/HCl) nahaste bat erabilita, eta erauzketa mikrouhinen bidez lagunduz. Erauzietan zegoen Fe, Ni, Zn, As Cr, Cd eta Pb elementuen kontzentrazioa Indukzio Bidez Akoplatutako Plasma - Masa Espektrometria (ICP-MS, *Inductively Coupled Plasma - Mass Spectrometry*) erabilita determinatu da (ikus 2. irudiko eskema).

2. irudia. Metalen eduki *pseudo*totalaren determinazioa, digestio azidoaren bidez.



SBET metodoa aplikatzean bukaerako disoluzioaren metal edukia ICP-MS bidez determinatu da. SBET metodoaren urin gastriko sintetikoa prestatzeko 0.4 M glizina den 2 L-ko disoluzioa prestatu da, HCl-rekin pHa 1.5era doituz (Kim et al., 2002). 3. irudian SBET prozeduraren eskema ikus daiteke.

3. irudia. SBET prozeduraren eskema.



ICP-MS analisia
(Fe, Ni, Zn, As, Cr, Cd eta Pb)
ICP-MS 7700 (Agilent Technologies)

Bioeskuragarritasunaren ehunekoa kalkulatzeko 1. ekuazioa erabili da, SBET bidez erauzitako metal edukia lurzoruaren eduki *pseudo*totalarekin zatituz.

$$\textbf{Bioeskuragarritasuna}\ (\%) = \frac{c_{SBET}}{c_{Totala*}} \cdot \mathbf{100} \qquad (1)$$

*c_{Totala}=kontzentrazio *pseudo*totala

3.3. Emaitzak

1. taulan aztertutako lurzoru-laginetako Fe, Ni, Zn, As, Cr, Cd eta Pb eduki *pseudo*totalaren batezbestekoa eta balio minimoa zein maximoa adierazi dira, eta jarraian RSDak (Relative Standard Desviation), balioen desbideraketa adierazten dutenak. Lurzoruen kalitatea aztertzeko Lurzoruen Legean definitutako metal bakoitzaren B-EBA muga-balioak ere ipini dira. B-EBA balioetan lau eremu ezberdintzen dira: haurren jolas-eremuak, hiriko guneak, parke publikoak eta industriaguneak. Balio guztiak mg·kg^{-1} unitateetan daude emanda.

1. taula. Lurzoruen metal edukia eta B-EBA balioak.

		Lurzoruen metal edukia (mg·kg^{-1})						
		Fe	**Ni**	**Zn**	**As**	**Cr**	**Cd**	**Pb**
	Batazbestekoa	22300	18.6	167	13.4	17.5	0.226	99
	Minimoa	6600	6.3	45	Detektatu gabe	8.2	Detektatu gabe	21
	Maximoa	40700	33.2	360	24.8	33.0	0.750	274
	%RSD	3.3	2.9	3.0	5.4	2.8	1.4	2.1
B-EBA balioak	**Haurren jolas-eremua**	*Ez dago B-EBA balio-rik Fe-ren-tzat.	110	*Gehienezko kontzentrazio onargarri eratorria g/kg hamarrekotan ematen da.	30	90	5	120
	Hiria		150		30	200	8	150
	Parke publikoa		500		30	400	25	450
	Industria		800		200	550	50	1000

1. taulan ikus daiteke hiriko lurzoruetan aztertutako Fe, Ni, Zn, As, Cr eta Cd edukia B-EBA balioen azpitik agertzen dela aztertutako puntu guztietan. Bestalde, berunaren kasuan, puntu gehienak lau eremuetarako definitutako B-EBA balioen azpitik badaude ere, zortzi lagin 120-274 mg·kg^{-1} kontzentrazio-tartean agertzen dira. Puntu horietatik zazpi parke publikoak dira eta bat industriagunetik gertu dago; beraz datu guztiak bakoitzaren erabilerarako definitutako erreferentzia-balioen azpitik daude Pb-ren kasuan ere.

Kokapen geografikoaren araberako joera orokorrak aztertzeko, NWAC (*Normalised-and-Weighted Average Concentration*) balioak kalkulatu dira. NWAC indizea kutsatzaileen metaketa-adierazlea da, lagin bakoitzarentzat kalkulatzen dena aztergai diren elementu guztien eragina aldi berean kontuan hartuz. Era honetan 1-10 bitarteko balioekin sailkatzen ditu aztertzen diren laginak edo laginketa-puntuak. NWAC balio-tarteak definitu, tarte bakoitzari kolore bat esleitu eta mapa batean koloretan adierazteak kutsatzaileen karga handieneko guneak zeintzuk diren identifikatzen lagun dezake(Gredilla et al., 2014).

Kasu honetan NWAC balioek metalen karga adierazten dute eta 4. irudian laginketa puntuetarako lortutako NWACak koloretan bereizi dira, lau balio-tarteren arabera.

4. irudia. Laginketa-puntuak NWAC balioen arabera koloreztatuta.

5. irudian ikusten diren puntu beltzak metal karga handienekoak dira eta bat datoz 1. taularen eztabaidan aipatutako berun eduki handiena duten zortzi lagin horiekin. Oro har, esan daiteke banaketa espaziala nahiko heterogeneoa dela.

Ikerketa eremuan neurtutako parametro fisiko-kimikoen (pH, eroankortasun elektrikoa, karbonatoak eta materia organikoa) eta aztertutako metal eta metaloideen artean erlaziorik ote zegoen aztertzeko korrelazio analisi bat burutu da (ikusi 2. taula).

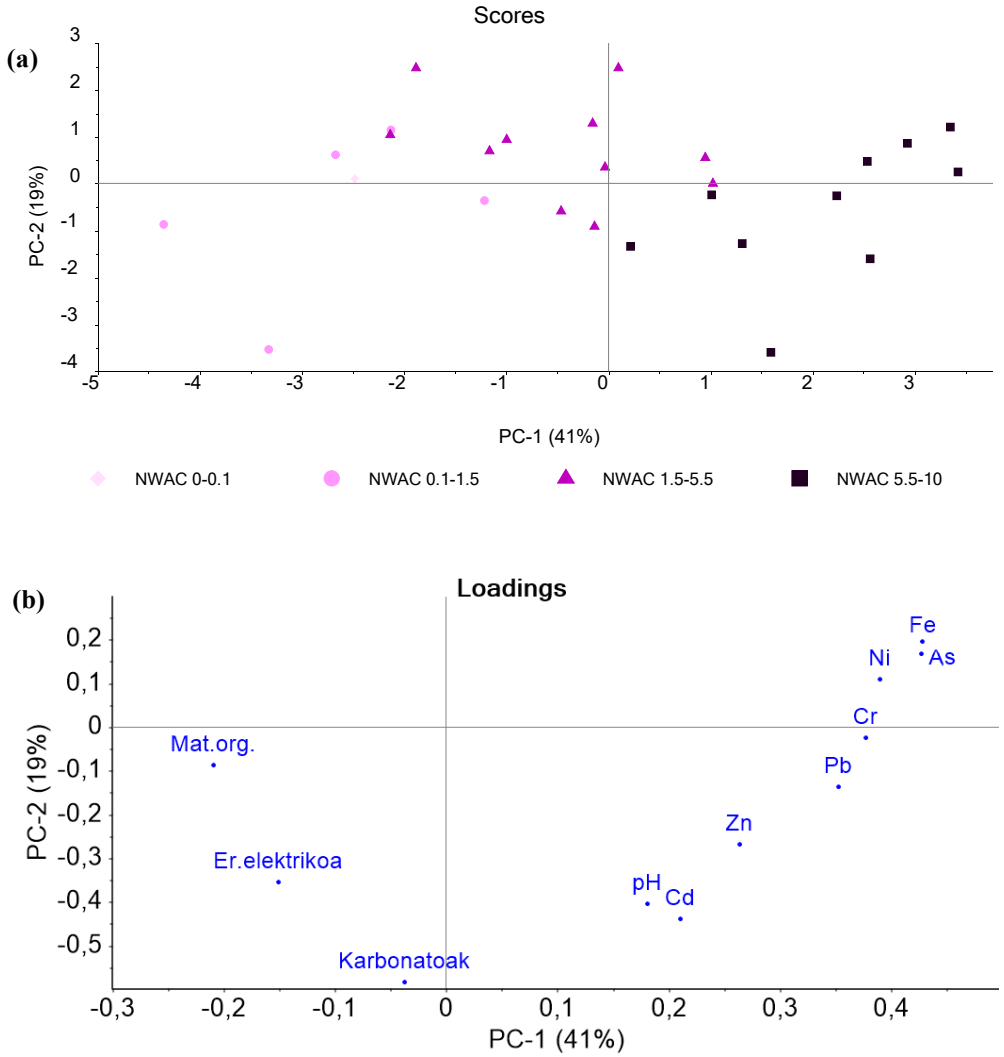
2. ekuazioa kontuan hartuta, lagin-kopurua (N) 27 izanik, konfiantza-tartea %99 eta dagokion t student balioa 2.4851, aldagaien arteko korrelazio esanguratsua kontsideratzeko r>0.4451 bete behar da; beraz kasu honetan zenbait aldagai-bikoteren artean korrelazio esanguratsua dagoela esan daiteke, handienetik txikienera: As-Fe (0.8790), Ni-Fe (0.8784), Cr-Fe (0.7513), As-Ni (0.7153), Cr-Ni (0.6762), Cr-As (0.6717), Pb-As (0.6399), Cd-Zn (0.5929), Pb-Zn (0.5672), karbonatoak-pH (0.5037), Pb-Cd (0.5006) eta Pb-Fe (0.4947).

$$t = \frac{r \cdot \sqrt{N-2}}{\sqrt{1-r^2}} \qquad (2)$$

Korrelazio-analisiko datuak aztertuz gero, badirudi metalen artean oro har korrelazio handia dagoela; hau da, Fe eduki handiko laginek Ni eduki handia daukatela, adibidez. Bestetik, parametro fisiko-kimikoen artean karbonatoen eta pH-aren arteko erlazioa ikus daiteke, lurzoruetako karbonatoen kopurua handitzean pH-a basikotu egiten dela, alegia. Ez da ordea erlazio handia antzeman aldagai fisiko-kimikoen eta metalen edukiaren artean.

Lagin bakoitzean analizatutako 4 aldagai fisiko-kimikoen eta 7 metalen kontzentrazio datuak kontuan izanik, 27 x 11 tamainako matrizea eratu da. Datuen matrizea sinplifikatzeko eta aldagaiak murrizteko Aldagai Nagusien Analisia (PCA, *Principal Component Analysis*) teknika erabili da. 3 aldagai nagusirekin bariantza azalduaren %73.7 adierazi da eta 5. irudian lehenengo bi aldagai nagusiekin lortutako *Scores* eta *Loadings* grafikoak ipini dira. Lehenak laginak aldagai berrien funtzioan adierazten ditu eta bigarrenean jatorrizko aldagaiek aldagai berrietan egiten duten ekarpena ikus daiteke.

5. irudia. PCAren Scores (a) eta Loadings (b) grafikoak.

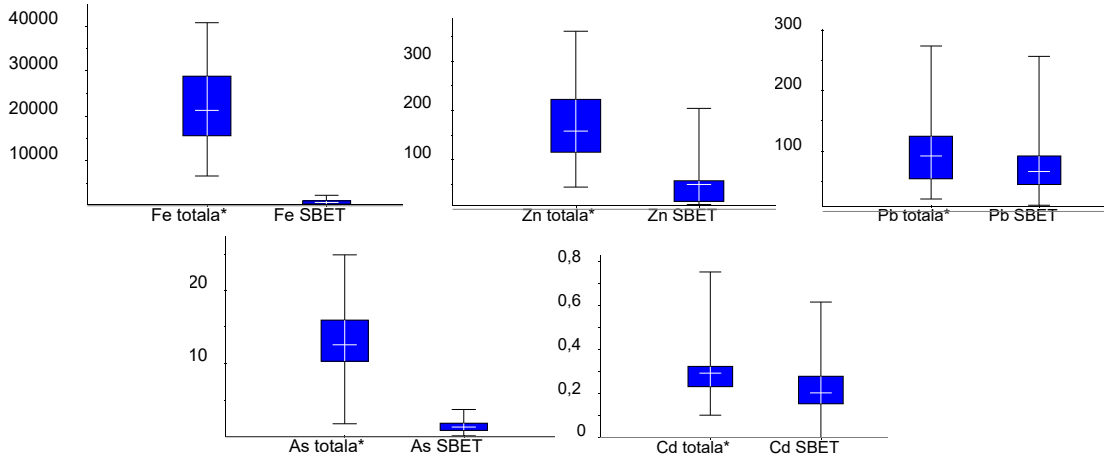


PC1 eta PC2 aldagai nagusiek definitutako Scores grafikoan (5a. irudia) laginak NWAC distribuzioan (4. irudia) lortu duten balio-tarteen arabera identifikatu dira. Horrela lau koloretan banatzen dira puntuak,. Grafikoan ikusten da NWAC balio baxuagoak dituzten laginak, hau da, aztertutako elementuen karga txikiagoa dutenak, grafikoaren ezkerraldean kokatzen direla eta NWAC balio altuagoa duten laginak, ordea, eskuinaldean kokatzen dira.

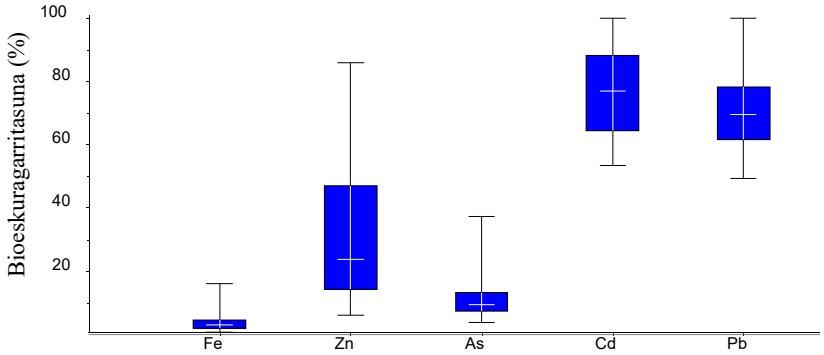
Bestalde, PC1-PC2 Loadings grafikoaren arabera (5b. irudia), lehenengo aldagai nagusiak (PC1) laginketa-puntuak elementuen kontzentrazioaren eta pH-aren arabera banatzen ditu. Horrekin batera, 2. taulan adieraziko korrelazio esanguratsuak baiezta daitezke Loadings grafikoarekin, aldagai-bikote horiek elkarrekiko gertu agertzen baitira.

Aztertutako metalen eta metaloideen bioeskuragarritasuna ebaluatzeko, 6. irudiko grafikoetan laginen metal eduki *pseud*ototalaren eta SBET bidez erauzitakoaren kontzentrazio-tarteak adierazi dira eta 7. irudian aztertutako metal batzuen bioeskuragarritasuna adierazi da, ehunekotan.

6. irudia. Metalen kontzentrazioa laginean (*pseudo*totala) eta SBET bidez erauzitakoa (bioeskuragarria) (mg·kg^{-1}-etan) (Grafikoaren goiko mugak maximoa adierazten du, behekoak minimoa, erdikoak batezbestekoa, kaxaren goiko mugak %75 kuartila eta kaxaren beheko mugak %25 kuartila).



7. irudia. Metalen bioeskuragarritasuna ehunekoetan (1. ekuazioarekin kalkulatuta. Grafikoaren goiko mugak maximoa adierazten du, behekoak minimoa, erdikoak batezbestekoa, kaxaren goiko mugak %75 kuartila eta kaxaren beheko mugak %25 kuartila).



6. eta 7. irudiak aztertuta, ikusten da burdina dela lurzoruetan presentzia handiena duen elementua baina bere bioeskuragarritasuna nahiko baxua da (%0.8-%16). Beruna nahiko ugaria da lurzoruan eta bioeskuragarritasuna altua (%49-%100). Zinka ere nahiko ugaria da eta bioeskuragarritasuna aldakorra den arren, oro har nahiko altua da (%6-%86). Artsenikoaren presentzia txikiagoa da eta bioeskuragarritasuna nahiko baxua (%4-%37). Cd edukia urria da, baina dagoena nahiko bioeskuragarri dago (%53-%100). Nikela eta kromoa 15 mg·kg^{-1} inguruko batezbestekoan agertzen dira lurzoruetan (ikus 1. taula) eta SBET bidez erauzitako kontzentrazioak detekzio-mugaren azpitik daude, hau da, ez dira bioeskuragarriak gure laginketa eremuan.

4. Ondorioak

- Laginen metal/metaloide edukia B-EBA balioen azpitik dago kasu guztietan. Gainera, Fe, Ni, Zn, As, Cr eta Cd elementuetarako lortutako kontzentrazioak haurren eremuei dagokien erreferentzia-balio zorrotzenaren azpitik daude kasu guztietan. Berunaren kasuan, aldiz, guztiek ez dute betetzen haurren eremu izateko bete behar den baldintza, bai, ordea, parke publiko gisa erabiltzeko baldintza.
- NWAC mapan ez da kokapen geografikoaren araberako joera orokorrik antzeman. NWAC sailkapena bat dator PC1-PC2 Scores grafikoko banaketa espazialarekin.

- Korrelazio-taulan azpimarratutako erlazioak bat datoz PC1-PC2 Loadings grafikoko adierazpenarekin. Izatez, metal/metaloide batzuen artean korrelazio nabarmena dago eta pHaren eta karbonatoen artekoa ere, baina parametro fisiko-kimikoen eta metal/metaloideen artean ez dago erlazio adierazgarririk.
- SBET metodoa erreminta egokia izan da metal bioeskuragarrienak identifikatu ahal izateko. Aztertutako laginketa-eremuan Zn, Pb eta Cd izan dira bioeskuragarritasun handieneko metalak eta Ni eta Cr ez dira bioeskuragarriak.

5. Etorkizunerako planteatzen den norabidea

Lan honetako metodologia erabilgarria izan daiteke haurren jolas-eremuetako nahiz beste gune batzuetako lurzoruaren kalitatea ebaluatzeko. Bestalde, metodologiaren egokitasuna ebaluatzeko beste metodologia osoago batekin aldera daiteke SBET metodoa.

6. Erreferentziak

4/2015 LEGEA, ekainaren 25ekoa, lurzorua kutsatzea saihestu eta kutsatutakoa garbitzekoa.

Bueno, A. S. (2017). *Clima . - Geografia e Historia de San Sebastian*. https://www.ingeba.org/liburua/donostia/3gfisica/31clima.htm (2023ko otsailaren 14ean berreskuratuta)

Ferreira-Baptista, L., eta De Miguel, E. (2005). Geochemistry and risk assessment of street dust in Luanda, Angola: A tropical urban environment. *Atmospheric Environment*, *39*(25), 4501–4512. https://doi.org/10.1016/J.ATMOSENV.2005.03.026

Gredilla, A., Fdez-Ortiz De Vallejuelo, S., De Diego, A., Arana, G., eta Madariaga, J. M. (2014). A new index to sort estuarine sediments according to their contaminant content. *Ecological Indicators*, *45*, 364–370. https://doi.org/10.1016/J.ECOLIND.2014.04.038

Kim, J.-Y., Kim, K.-W., Lee, J.-U., Lee, J.-S., eta Cook, J. (2002). Assessment of As and Heavy Metal Contamination in the Vicinity of Duckum Au-Ag Mine, Korea. *Environmental Geochemistry and Health 2002 24:3*, *24*(3), 213–225. https://doi.org/10.1023/A:1016096017050

Ljung, K., Oomen, A., Duits, M., Selinus, O., eta Berglund, M. (2007). Bioaccessibility of metals in urban playground soils. *Http://Dx.Doi.Org/10.1080/10934520701435684*, *42*(9), 1241–1250. https://doi.org/10.1080/10934520701435684

Petruzzelli, G., Pedron, F., eta Rosellini, I. (2020). Bioavailability and bioaccessibility in soil: a short review and a case study. *AIMS Environmental Science*, *7*(2), 208–225. https://doi.org/10.3934/environsci.2020013

Poggio, L., Vrščaj, B., Hepperle, E., Schulin, R., eta Marsan, F. A. (2008). Introducing a method of human health risk evaluation for planning and soil quality management of heavy metal-polluted soils-An example from Grugliasco (Italy). *Landscape and Urban Planning*, *88*(2–4), 64–72. https://doi.org/10.1016/J.LANDURBPLAN.2008.08.002

TC WI. (2003). *TC WI Chemical Analyses-Determination of loss on ignition in sediment, sludge, soil, and waste.*

Turner, A. (2011). Oral bioaccessibility of trace metals in household dust: a review. *Environmental Geochemistry and Health*, *33*(4), 331–341. https://doi.org/10.1007/S10653-011-9386-2

USEPA. (2011). *Update for Chapter 5 of the Exposure Factors Handbook Soil and Dust Ingestion*.

7. Eskerrak eta oharrak

Lan honek UPV/EHU-ko Campus Bizia Lab Programaren (22GARM) dirulaguntza jaso du eta horrekin batera Ainhoa Lekuonak UPV/EHU-k emandako doktorego aurreko beka eskertu nahi du.

Ingurumen-kutsaduraren isla jaioberrien lehen elikagaian: substantzia arrotzen analisia ama-esnean

Inés Baciero[1,2], Maider Ayerra[1], Mikel Musatadi[1,2], Maitane Olivares[1,2], Ailette Prieto[1,2], Olatz Zuloaga[1,2]

(1) Kimika Analitikoa saila, Euskal Herriko Unibertsitatea (UPV/EHU), 48940 Leioa, Euskadi, Espainia, (2) Itsas Biologia eta Bioteknologia Esperimentalen Ikerketa Zentroa, Euskal Herriko Unibertsitatea (PiE-UPV/EHU), 48620 Plentzia, Euskadi, Espainia.
ines.baciero@ehu.eus

Laburpena

Gaur egun ezagutzen den gaixotasun anitz ingurumen-kutsadurari estuki lotuta dago. Kutsatzaile horien menpe egotearen eta horrek dakartzan osasun-arazoen ikerketari "esposoma" deritzo. Gorputzari arrotzak zaizkion substantziak (xenobiotikoak) eta euren metabolitoak milaka dira eta hainbeste konposatu batera aztertzea erronka handia da analisiaren ikuspegitik. Ondorioz, espektro zabaleko konposatuen analisiak mahaigaineratzen dira. Matrize gisa, ama-esnea jariakin biologiko interesgarria da, kutsatzaileak hor metatu eta, amaren esposizioa ez ezik, jaioberriarena ere ikertzeko balioko bailuke. Testuinguru horretan, lan honen helburua esnetan 187 xenobiotiko eta metabolito analizatzeko metodoa fintzea da, etorkizunean Ama-Esnearen Euskal Bankura dohaintzan emandako esnea aztertzeko.

Hitz gakoak: esposoma, xenobiotikoak, hidrolisi entzimatikoa, laginaren tratamendua, likido kromatografia, bereizmen handiko masa-espektrometria.

Abstract

A part of current diseases is related to the environmental contamination we are daily exposed to. The study of the exposure and consequent health issues is known as "exposome". One of the main throwbacks this type of studies own is the huge number of pollutants (and potential metabolites) of interest. Consequently, broad-scoped analyses are suitable options when coping with those numbers. As target matrix, breast milk is of special interest, since contaminants accumulate there, affecting both mother and nursing child. Based on the above mentioned, the aim of this project is to develop analytical procedures to study the presence of 187 xenobiotics and related metabolites in breast milk, to analyze milk samples from the Basque Bank of Breast Milk in the future.

Keywords: exposome, xenobiotics, enzymatic hydrolysis, sample treatment, liquid chromatography, high-resolution mass spectrometry.

1. Sarrera eta motibazioa

Gizakiak ingurumen-kutsatzaileekiko esposizio etengabea jasaten du, kutsatutako airea arnastuz edo elikagaiak, edateko ura edo hautsa barneratuz (Roosens et al., 2010). Kutsatzaileekiko giza-esposizioa osasun publikoaren arloko kezka nagusietakoa da (Beser et al., 2019), gizakiak kaltegarriak izan daitezkeen ingurumeneko hainbat kimikoren eraginpean baitaude. Minbizia, gaixotasun kardiobaskularrak, arnas-gaixotasunak eta 2. motako diabetesa, besteak beste, giza populazioetako erikortasun- eta hilkortasun-kausa nagusien artean daude; aitzitik, aldaketa genetikoek gaixotasun konplexu horien kausen zati txikia baino ez dute azaltzen, gaixotasun horien askoren eragilea ingurumen-kutsatzaileekiko esposizioa baita (Cui et al., 2016).

2005ean, Christopher Wild doktoreak, Minbizia Ikertzeko Nazioarteko Agentziako zuzendariak, lehengo aldiz *esposoma* terminoa definitu zuen "jaio aurreko garaitik pertsona baten bizitzan zehar gertatzen diren ingurumen-erakusketen bizi-ikastaroa" bezala (Wild, 2005). Gaur egun, esposoma terminoa bizitzako etapa guztietako ingurumen-esposizio osoari erreferentzia egiteko erabili da eta, zalantzarik gabe, gaixotasun kronikoen garapenean funtsezko zeregina duela adierazi da (Wild, 2012).

Eguneroko jarduerek eta industriak, besteak beste, organismo baten ohiko osaketan edo metabolismoan ezohikoak diren edo batere agertzen ez diren osagaiak (xenobiotikoak) askatzen dituzte ingurumenera. XX. mendean zehar, kutsatzaile organiko anitz isuri zen atmosferara,

bifenilo polikloratuak (PCBak), plagizida organokloratuak (OCPak) edo hidrokarburo aromatiko poliziklikoak (PAHak), besteak beste (van der Oost et al., 2003). Haatik, horiek oraindik aurkitzen diren arren, gaur egun aski ezaguna da gizakiak bestelako kutsatzaileren eragina jasaten duela. Horien artean, aipagarri dira farmakoak eta norberaren zaintzarako produktuak (Daughton & Ternes, 1999; Liu et al., 2020; Yang et al., 2017), surfaktante diren konposatu per- eta polifluoroalkilatuak (PFASak) (Gomis et al., 2018; Wang et al., 2017) eta pestizida modernoak (Wang et al., 2023).

Kutsatzaileen presentzia ingurumenean aztertu da, baina, azken urteotan, arreta berezia jarri zaie matrize biologikoetako esposizio-biomarkatzaileei; gernuan, plasman edo ama-esnean ingurumen-kutsatzaileen gorputz-karga ebaluatu nahian (Wild, 2012). Ama-esnea konposizioz etengabe aldatzen ari den matrize konplexua da (Lehmann et al., 2018) eta, gizakion lehen elikagaia izanik, interesgarria da hura aztertzea xenobiotikoen presentziari dagokionez. Izan ere, edoskitzeak abantaila ugari eskaintzen dizkie haurrei, hazkuntzan eta garapen kognitibo, psikologiko zein immunologikoan (Anadón et al., 2017); aitzitik, kutsatzaile desberdinak amaren odoletik esnera transferi daitezke eta bular-esnea izan umeentzako zeharkako kutsadura-iturri (Lehmann et al., 2018).

Testuinguru horretan, eta kontuan izanda matrize ez-inbaditzailea eta gantzetan aberatsa dela, ama-esnea kutsatzaileekiko esposizioa ebaluatzeko itu aproposa da (Huang et al., 2020).

2. Arloko egoera eta ikerketaren helburuak

Esnea bezalako jariakin koipetsuetan, traza-mailako kutsatzaile anitzen analisia erronka handia da (Baduel et al., 2015). Halaber, matrize konplexua ez ezik, esneak konposizio hagitz aldakorra erakusten du. Horrek konposatu polarren zehazpena zaildu egiten du (Adenuga et al., 2020) eta literaturako analisi gehienak natura ez-polarreko lehentasunezko konposatu klasikoetara mugatuta daude (Baduel et al., 2015).

Esposomaren ikerketak intereseko analito anitz du, ondorioz, jarraituriko metodologia analitikoak ezin du oso espezifikoa izan, alderantziz, analito-helmen ahalik eta orokorrena izan behar du, esposizio potentzialen argazkirik osoena izateko (Díaz et al., 2012). Horretan oinarrituta, laginaren tratamenduari dagokionez, intereseko konposatuak esnetik erauzteko, ohikoa da likido-likido erauzketa erabiltzea (LLE) (Baduel et al., 2015; Lopes et al., 2016); lorturiko erauzkina sakonago purifikatzeko tekniken artean, ordea, proteinen hauspeaketa hotza, fase solidoko erauzketa (SPE) eta tamainaren bidezko garbiketa-zutabeak (iragazkiak) dira aipagarri (Devanathan et al., 2012; Lopes et al., 2016; Musatadi et al., 2021).

Analisiari begira, likido-kromatografia (LC) konposatu organiko polarren detekzioaren aurretik asko erabiltzen den separazio-teknika da (Jamin et al., 2014). Detekzio-etapari dagokionez, masa-espektrometria (MS) da lan berrienetan gehien erabiltzen dena (Baduel et al., 2015; Hermo et al., 2008). Horretan, azpimarratzekoa da bereizmen altuko tandem masa-espektrometria (HRMS/MS), zeinak analisi bideratua ez ezik, bideratu gabeko analisiak egiteko aukera ematen duen. Labur, susmagarrien analisi ez-bideratuan, laginean egon litezkeen konposatuak (susmagarriak, “ezagun ezezagunak”) milaka sarrerako zerrendetan bilduta daude. Aldi berean, HRMS/MS detektagailuak laginean dauden konposatu ugarienen analisia ahalbidetzen du (eta ez konposatu zehaztuena), horrela, laginaren analisi “osoa” aurrera eraman daiteke. Amaieran, zerrendak eta laginean aurkitutakoa konparatuz, esposomikari askoz hobeto egokitzen zaion susmagarrien analisia eraman daiteke aurrera.

Arestian azaldurikoa kontuan hartuz, jarraian aurkezten den proiektuaren helburua ama-esnean LC-HRMS/MS bidezko xenobiotiko analisia burutzeko metodo analitikoa fintzea da, ikerketa-taldearen aurreko aurkikuntzetan oinarrituta (Musatadi et al., 2021). Bilatzen den metodo analitikoaren jomuga analito-helmen handia izatea da; hori lortzeko, ohiko erabilerako farmakoak, kosmetikoen osagaiak, pestizidak, plastifikatzaileak, gehigarri industrialak eta abar jasotzen dituen xenobiotiko-sorta aztertu da, abiapuntua 187 konposatu izanik (bai xenobiotiko askeak bai horien I. eta II. faseko zenbait metabolito kontsideratuz). Garaturiko metodo analitikoa

behin berretsita, lagin errealei aplikatu ahalko zaie eta, etorkizunari begira, susmagarrien analisira mugituko da. Amaieran, proiektu honek Ama-Esnearen Euskal Bankuko laginak aztertzea du helburu, Euskadi-mailan bular-emaileen esposizioa aztertzeko.

3. Ikerketaren muina

Lan honen ekarpena Musatadiren eta lankideen protokoloaren bi urratsetan ardaztu da (Musatadi et al., 2021). Labur, analitoen erauzketa burutzeko, 1 mL ama-esneri gatz-sorta (0.5 g sodio sulfato eta 0.1 g sodio kloruro) eta erauzlea (3 mL azetonitrilo) gehitu zaizkio. Vortex bidezko irabiaketaren eta zentrifugazioaren ostean, analitodun fase organikoa banatu eta izozkailuan (-20 ºC) gorde da 12 orduz, igarotako proteinak desnaturalizatu eta hauspeatzeko. Fase garbia berriz banatu eta iragazki polimerikoen bidezko garbiketa jasan du. Azken erauzia N_2 korrontepean (35 ºC) kontzentratu eta % 20 dimetil sulfoxidotan (DMSO) den ur-disoluzioan berreratu da, iragazi (0.22 µm-ko poro-diametroa) eta LC-HRMS/MS bidez analizatzeko.

Aurrekoa abiapuntu gisa hartuta, alde batetik, garbiketa-urratsean iragazki polimeriko gehiago frogatu da, baita gorabidean dagoen *Dilute & Shoot* delakoa egokitu ere. Bestetik, esnean egon litezkeen kutsatzaile metabolizatuak ere kontuan hartu nahi izan dira; horretarako, entzima bidezko hidrolisiak proposatu dira. Gainerako parametroak (bai erauzketaren optimizazioa, bai analisi instrumentalaren nolakotasunak) berdin mantendu dira (Musatadi et al., 2021). Oro har, laginaren tratamendua berez luzea ez den arren, 2-3 egunetan zehar banatu behar da, 12 orduko proteinen hauspeaketa hotza gauan zehar burutzen da-eta, baita hidrolisi-baldintza batzuk ere (ikus 3.2 atala). Analisi instrumentalari dagokionez, 25 minutu behar dira lagineko.

Laborategiko protokoloa doitzeko, ama-esneari intereseko analitoak gehitu zaizkio tratamenduaren puntu ezberdinetan: aldaera bakoitzari dagokionez, hiru erreplika hasieran dopatu dira (hots, analitoak 1 mL esneri gehitu zaizkio zuzenean) eta beste hiru erreplika, ordea, protokoloa bukatu baino arinago, justu analisi instrumentalaren aurretik. Bi kasuetan, azken erauzian analito bakoitzaren 100 ng/g izatea espero da. Estrategia horrekin, alde batetik, konposatu bakoitza zer ehunekotan berreskuratu den kalkula daiteke (1. formula), hasieran dopatu diren eta protokolo osoa jasan duten laginez baliatuz. Bestetik, justu bukaeran dopatu diren laginetan, idealki, % 100eko berreskurapena espero da, kasu horretan ez baita egon galerarik eragingo duen inolako tratamendurik. Haatik, matrizeak berak (kasu honetan, esnearen bestelako osagaiek) analitoen seinalean eragin dezake, horren intentsitatea handituz edo murriztuz (Niessen et al., 2006). Desbiderapen horri, alegia, "matrize-efektu" deritzo (ikus 2. formula). Matrize-efektuaren balioa zero baino handiagoa denean matrize-efektu positiboa dugula deritzogu, zero azpitik dagoenean, ordea negatiboa. Helburua, ka, matrize-efektua minimizatzea da; hots, % 0tik gertu egotea bilatuko da (matrize-efektua nulua izanik kasu horretan).

$$\text{Berreskurapena (\%)} = \frac{\text{detektatutako analito}-\text{masa}}{\text{hasieran gehitutako analito}-\text{masa}} \cdot 100 \quad \textbf{(1)}$$

$$\text{Matrize} - \text{efektua (\%)} = \left(1 - \frac{\text{detektatutako analito}-\text{masa}}{\text{analisia baino lehen gehitutako analito}-\text{masa}}\right) \cdot 100 \quad \textbf{(2)}$$

Azkenik, laginaren tratamenduan zehar albo-kutsadurarik ez dagoela bermatzeko, hiru esne-zuriak (analitorik gehitu ez zaienak) ere kontsideratu dira. Guztira, burututako baldintza esperimental bakoitzarekin bakoitzarekin bederatzi esne-erreplika tratatu dira (hiru zuri, hiru hasieran dopatuak eta hiru amaieran dopatuak).

Aurkeztutako aldagai horietaz baliatuz, laginaren garbiketa (ikus 3.1 atala) eta aurretiazko hidrolisi entzimatikoa (3.2 atala) aztertu eta findu dira. Lehendabizikoan, erauzketan eramandako interferentziak kentzea bilatu da, bai matrize-efektua bai analito-galerak minimoak izan daitezen. Hidrolisi entzimatikoaren kasuan, esneak izan litzakeen kutsatzaileen glukuronidoak eta sulfatoak modu eraginkorrean liseritzeko baldintza anitz frogatu da. Aipatzekoa da jarraian ageri diren emaitzak ikerketaren laburpena direla eta erabilitako analito-zerrenda osoa, bakoitzaren parametro guztiak eta gainerako xehetasun oro prestaketan dagoen artikulu zientifikoan aurkeztuko direla (Baciero et al., argitaratu gabe).

3.1 Laginaren garbiketa: iragazki polimerikoak eta *Dilute and Shoot (D&S)*

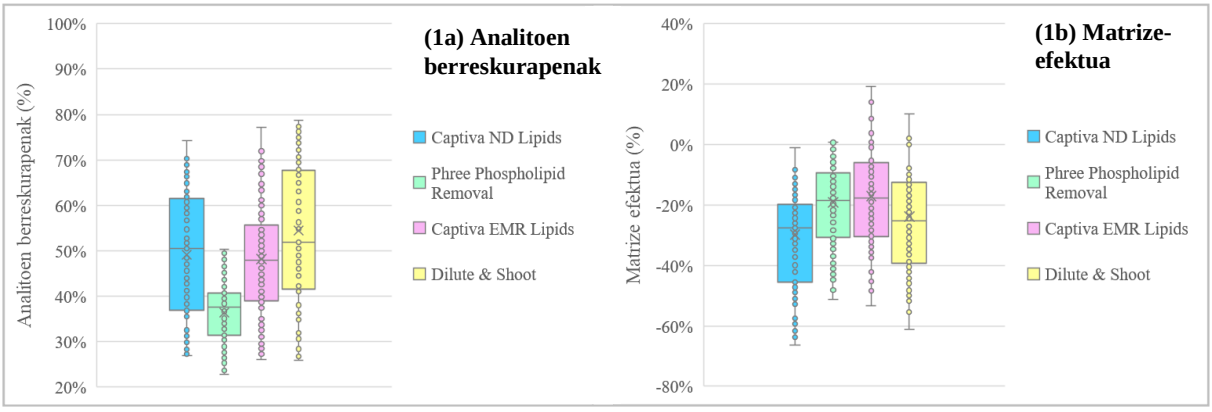
Garbiketa-urratsaren doikuntzan, lau izan dira erkaturiko metodologiak: hiru iragazkien bidezko purifikazio eta garbiketa-urratsik gabeko prozedura (*Dilute and Shoot*, D&S). Laurak proteinak hotzean hauspeatzeko urratsaren ostean ezarri dira. Hain zuzen, hiru iragazkiak *Captiva ND Lipids* (hemendik aurrera, "Captiva ND") (Musatadi et al., 2021), *Captiva EMR Lipids* ("Captiva EMR") eta *Phree Phospholipid Removal* ("Phree") dira, bakoitza bere zehazpen teknikoekin erabilerari dagokionez (jasan dezakeen lagin kantitatea, lagin horren osagai organikoaren proportzioa eta abar). D&Sri dagokionez, hauspeatutako proteinak kendu ostean, erauziak zuzenean kontzentratu dira, analisirako % 20 DMSOtan den ur-disoluziora eramateko.

Aipaturiko lau aldaeren etekinak eta kasuan kasu pairaturiko matrize-efektua, hurrenez hurren, 1. irudian ikus daitezke. Oro har, etekin egokiak lortu dira bi Captiva iragazkiekin eta D&S metodologiarekin; Phree filtroek, ordea, berreskurapen hagitz baxuak eman dituzte (1a). Estatistikoki (% 95eko konfiantza-mailan), hala frogatu da: Phree iragazkiek berreskurapen baxuagoak lortu dituzte beste hiru metodoekiko erkatuta ($p<0,05$); aldi berean, D&S izan da berreskurapen altuenak izan dituen aldaera ($p<0,05$) eta, azkenik, bi Captiva metodoen batezbestekoak konparagarriak izan dira ($p>0,05$).

Aurrekoaz aparte, tratamendu bakoitza zenbat analito kuantitatiboki berreskuratzeko gai den begiratu da; hots, zenbat konposatu detektatu daitezkeen % 30-130 bitarteko berreskurapenekin. Proposatutako 187 xenobiotikoetatik, Captiva EMR izan da kopuru handiena berreskuratzea ahalbidetu duena: iragazki-mota horrek konposatuen % 62 izan du % 30-130 tartean; gainerako bideek, aldiz, ez hainbeste (Captiva NDk % 55, Phreek % 43 eta D&Sek % 52).

Matrize-efektuari begira (1b), amaieran dopaturiko laginen artean, seinaleek desbiderapen handiena jasan dute Captiva ND eta D&S protokoloekin eta bi horiek elkarrekiko konparagarriak dira % 95eko konfiantza-mailan ($p>0,05$). Haatik, Phree eta Captiva EMR iragazkiek matrize-efektu txikiagoa erakutsi dute aurreko biek baino ($p<0,05$). Era berean, Phree eta Captiva EMR protokoloen artean ez dago ezberdintasun esanguratsurik matrize-efektuari dagokionez ($p>0,05$). Aitzitik, aipatzekoa da laborategian ikusi dela Captiva EMR filtroek hoberen kentzen dituztela esnearen gantzak; izan ere, gainerako kasuetako erreplika batzuetan fase lipidiko apurra ikus zitekeen.

1. irudia. Hurrenez hurren, garbiketa bakoitzarekin izandako analitoen berreskurapen-maila (1a) eta jasandako matrize-efektua (1b).



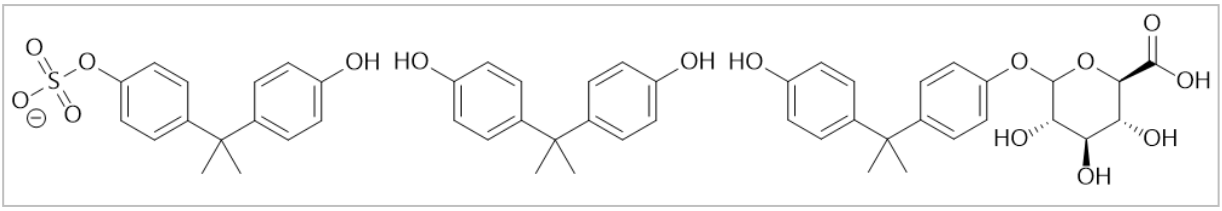
Atal honetan azaldutakoa kontuan hartuz, lehenik eta behin, Phree iragazkien bidea baztertu egin da, analito-galera handienak izan dituelako. Gainerakoen artean, D&Sek izan ditu konposatuen banakako berreskurapen handienak, baina baita matrize-efektu handienetarikoa ere (Captiva NDrekin batera). Captiva NDk eta EMRk konposatuen banakako berreskurapen konparagarriak izan dituzte, baina bigarrenak analito gehiago berreskuratu ditu, matrize-efektu txikiagoarekin gainera. Ondorioz, Captiva ND ere baztertu da, EMRren alde. Azkenik, nahiz eta

D&Sek berreskurapen indibidual hobeak izan, Captiva EMRk analito gehiago berreskuratu ditu kuantitatiboki (% 62, D&Sren % 52ren aurrean). Egia da bere berreskurapen indibidualak ez direla D&Srenak baino hobeak izan; hala eta guztiz ere, egokiak izan dira. Halaber, matrize-efektu urriagoa pairatu da EMRren bidean;,begi-bistaz erauzi garbiagoak erakutsiz, gainera. Hori guztia dela bide, Captiva EMR hautatu da garbiketa optimo gisa.

3.2 Hidrolisi entzimatikoa: β-glukuronidasa vs. β-glukuronidasa/arilsulfatasa

Ama-esnean, eraldatu gabeko kutsatzaileak aurki daitezke, baina espero izatekoa da eurek prozesu metabolikorik pairatzea, hori baita gorputzaren mekanismoa substantzia arrotzak kanporatzeko. Hori horrela, jariakin biologikoan xenobiotiko-zama osoa kuantifikatzea da interesgarria (zatiki askea gehi glukuronido eta/edo sulfato eran dagoena, ikus 2. irudia).

2. irudia. A bisfenola (erdian) eta bere bi metabolito: sulfatoa (ezkerrean) eta glukuronidoa (eskuinean).



Horretarako, aurkeztutako metodoan entzimen bidezko hidrolisia txertatzea frogatu da, esneak eduki litzakeen xenobiotikoen glukuronidoak eta sulfatoak askatzeko. Hain zuzen, erauzketa baino lehen, esneari hidrolasa entzimak gehitu zaizkio. Halaber, euren funtzioa betetzeko, entzimek tenperatura eta pH jakinak behar dituzte; baldintzok bermatzeko, 200 µL disoluzio indargetzaile gehitu zaio 1 mL esneri eta laginak 37 ºC-an inkubatu dira. Oro har, burututako frogetan entzima-mota, kantitate eta inkubazio-tarte ezberdinak kontsideratu dira, 1. taulan jasota:

1. taula. Hidrolisi entzimatikorako frogatu diren baldintzen aldagaien balioak.

Baldintza-sorta	Entzima mota	Entzima kantitatea eta lanerako pHa	Inkubazio-denbora
A	β-glukuronidasa (*Helix pomatia*)	20 µL; pH 5,0	2 h
B	β-glukuronidasa/arilsulfatasa (*Helix pomatia*)	10 µL; pH 5,5	2 h
C	β-glukuronidasa/arilsulfatasa (*Helix pomatia*)	50 µL; pH 5,5	2 h
D	β-glukuronidasa/arilsulfatasa (*Helix pomatia*)	50 µL; pH 5,5	12 h

Baldintzak antolatzerako orduan, abiapuntua ikerketa-taldearen aurreko lanetan erabilitakoak izan dira (Musatadi et al., 2022). Horretan, β-glukuronidasa entzimaren bidezko hidrolisirako parametroak jadanik findu ziren; hortaz, lehendabiziko baldintza-sorta eurek ontzat emandakoa izan da (1. taulan, A esperimentua). Aitzitik, sulfatoen presentzia ere kontuan hartzeko, oraingoan sulfatasa funtziodun entzima frogatu nahi izan da (B-D esperimentuak), hidrolisi “arinagoak” (B) zein “bortitzagoak” (D) probatuz, entzima-kantitateari eta inkubazio-denborari dagokionez.

Atal hori aztertzeko erabilitako metabolitoei begira, jadanik erabilitako kutsatzaileen forma glukuronidoak eta sulfatoak kontsideratu dira. Gainera, glukuronidoen kasuan, azido glukuronikoa molekularen amina-taldeei (N-Gluk), alkoholei (O-Gluk) edota azido karboxilikoei (COO-Gluk) lot dakieke, hidrolisiaren eraginkortasuna ezberdin suertatuz, kasuan kasu (Dwivedi et al., 2018). Ondorioz, glukuronidoak aukeratzeko orduan, hiru motetatik gutxienez bana kontsideratu da. Guztira, bi O-glukuronidoren, N- eta COO-glukuronido banaren eta bi sulfatoren jokabidea aztertu da, proposaturiko A-D baldintza hidrolitikoetan.

Jasotako emaitzei dagokionez, O-glukuronidoak eta bi sulfatoak frogatutako lau baldintzetan kuantitatiboki (% 95-100) liseritu dira. N- eta COO-glukuronidoei dagokionez, hidrolisi-tasa maximoa D baldintzetan eman da, forma metabolizatuen konbertsioa % 63 eta % 100 izanik, hurrenez hurren. Hori horrela, entzima bidezko hidrolisirako D baldintzak hartu dira ontzat.

4. Ondorioak

Aurkeztutako proiektuan, ama-esnean xenobiotiko anitzen presentzia aztertzeko metodo analitikoa findu da. Horrela, protokoloaren garbiketa-urratsa ondu da, analitoen berreskurapen-etekinak hobetu eta matrize-efektua urritzen duten Captiva EMR Lipids iragazkiak inplementatuta. Era berean, xenobiotiko askeez aparte, forma metabolizatuak ere kontuan hartzeko, hidrolisi-urrats kuantitatiboa gehitu da. Azken horretan, hala ere, N-glukuronidoekin froga gehiago egin liteke, proposatutako digestio-baldintzak ez baitira nahikoak izan horiek guztiz askatzeko.

5. Etorkizunerako planteatzen den norabidea

Findutako metodoa prest dago kontzentrazio-maila ezberdinetan berretsia izateko eta hori izango da ikerketaren ondorengo urratsa. Behin metodoa berretsi dela, lagin errealetan aplikagarri izango da eta, analisi bideratuaz aparte, susmagarrien analisia burutzea ahalbidetuko du; hori baita, azken finean, azaldutako ikerketa mahaigaineratzearen zergatia. Horrela, azter daitekeen konposatu-espektro zabalaz baliatuz, ama-esnean esposoma aztertzeko erramintak lortuko dira. Hain zuzen, aipatutako susmagarrien analisi bakoitzean, aldibereko 14.000 susmagarriren ikerketa eramango da aurrera. Izan ere, bereizmen altuko masa espektrometriak (HRMS) aurretiaz estandar kimikoak erosi gabe susmagarrien analisia aurrera eramatea bermatzen du. Amaitzeko, landutako analisi-metodoak erabiliz, etorkizun hurbilean, Ama-Esnearen Euskal Bankuko laginak ikertuko dira, Euskadi-mailan bular-emaileen esposizioa argitzeko.

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

Anadón, A., Martínez-Larrañaga, M. R., Ares, I., Castellano, V., & Martínez, M. A. (2017). Drugs and Chemical Contaminants in Human Breast Milk. In *Reproductive and Developmental Toxicology* (or. 67–98). Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804239-7.00005-6

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

Beser, M. I., Pardo, O., Beltrán, J., & Yusà, V. (2019). Determination of 21 perfluoroalkyl substances and organophosphorus compounds in breast milk by liquid chromatography coupled to orbitrap high-resolution mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, *1049*, 123–132. https://doi.org/10.1016/j.aca.2018.10.033

Cui, Y., Balshaw, D. M., Kwok, R. K., Thompson, C. L., Collman, G. W., & Birnbaum, L. 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

Daughton, C. G., & Ternes, T. A. (1999). Pharmaceuticals and personal care products in the environment: Agents of subtle change? *Environmental Health Perspectives*, *107*, 32.

Devanathan, G., Subramanian, A., Sudaryanto, A., Takahashi, S., Isobe, T., & Tanabe, S. (2012). Brominated flame retardants and polychlorinated biphenyls in human breast milk from several locations in India: Potential contaminant sources in a municipal dumping site. *Environment International*, *39*(1), 87–95. https://doi.org/10.1016/j.envint.2011.10.005

Díaz, R., Ibáñez, M., Sancho, J. V., & Hernández, F. (2012). Target and non-target screening strategies for organic contaminants, residues and illicit substances in food, environmental and human biological samples by UHPLC-QTOF-MS. *Anal. Methods*, *4*(1), 196–209. https://doi.org/10.1039/C1AY05385J

Dwivedi, P., Zhou, X., Powell, T. G., Calafat, A. M., & Ye, X. (2018). Impact of enzymatic hydrolysis on the quantification of total urinary concentrations of chemical biomarkers. *Chemosphere*, *199*, 256–262. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.01.177

Gomis, M. I., Vestergren, R., Borg, D., & Cousins, I. T. (2018). Comparing the toxic potency in vivo of long-chain perfluoroalkyl acids and fluorinated alternatives. *Environment International*, *113*, 1–9. https://doi.org/10.1016/j.envint.2018.01.011

Hermo, M. P., Nemutlu, E., Kır, S., Barrón, D., & Barbosa, J. (2008). Improved determination of quinolones in milk at their MRL levels using LC–UV, LC–FD, LC–MS and LC–MS/MS and validation in line with regulation 2002/657/EC. *Analytica Chimica Acta*, *613*(1), 98–107. https://doi.org/10.1016/j.aca.2008.02.045

Huang, M., Li, J., Xiao, Z., & Shi, Z. (2020). Tetrabromobisphenol A and hexabromocyclododecane isomers in breast milk from the general population in Beijing, China: Contamination levels, temporal trends, nursing infant's daily intake, and risk assessment. *Chemosphere*, *244*, 125524. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.125524

Jamin, E. L., Bonvallot, N., Tremblay-Franco, M., Cravedi, J.-P., Chevrier, C., Cordier, S., & Debrauwer, L. (2014). Untargeted profiling of pesticide metabolites by LC–HRMS: An exposomics tool for human exposure evaluation. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, *406*(4), 1149–1161. https://doi.org/10.1007/s00216-013-7136-2

Lehmann, G. M., LaKind, J. S., Davis, M. H., Hines, E. P., Marchitti, S. A., Alcala, C., & Lorber, M. (2018). Environmental Chemicals in Breast Milk and Formula: Exposure and Risk Assessment Implications. *Environmental Health Perspectives*, *126*(9), 096001. https://doi.org/10.1289/EHP1953

Liu, N., Jin, X., Feng, C., Wang, Z., Wu, F., Johnson, A. C., Xiao, H., Hollert, H., & Giesy, J. P. (2020). Ecological risk assessment of fifty pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in Chinese surface waters: A proposed multiple-level system. *Environment International*, *136*, 105454. https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.105454

Lopes, B. R., Barreiro, J. C., & Cass, Q. B. (2016). Bioanalytical challenge: A review of environmental and pharmaceuticals contaminants in human milk. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, *130*, 318–325. https://doi.org/10.1016/j.jpba.2016.06.012

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. https://doi.org/10.3390/separations8020014

Musatadi, M., Caballero, C., Mijangos, L., Prieto, A., Olivares, M., & Zuloaga, O. (2022). From target analysis to suspect and non-target screening of endocrine-disrupting compounds in human urine. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, *414*(23), 6855–6869. https://doi.org/10.1007/s00216-022-04250-w

Niessen, W. M. A., Manini, P., & Andreoli, R. (2006). Matrix effects in quantitative pesticide analysis using liquid chromatography–mass spectrometry. *Mass spectrometry reviews*, *25*(6), 881-899. https://doi.org/10.1002/mas.20097

Roosens, L., D'Hollander, W., Bervoets, L., Reynders, H., Van Campenhout, K., Cornelis, C., Van Den Heuvel, R., Koppen, G., & Covaci, A. (2010). Brominated flame retardants and perfluorinated chemicals, two groups of persistent contaminants in Belgian human blood and milk. *Environmental Pollution*, *158*(8), 2546–2552. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2010.05.022

van der Oost, R., Beyer, J., & Vermeulen, N. P. E. (2003). Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: A review. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, *13*(2), 57–149. https://doi.org/10.1016/S1382-6689(02)00126-6

Wang, L., Zhang, Z.-F., Liu, L.-Y., Zhu, F.-J., & Ma, W.-L. (2023). National-scale monitoring of historic used organochlorine pesticides (OCPs) and current used pesticides (CUPs) in Chinese surface soil:

Old topic and new story. *Journal of Hazardous Materials*, *443*, 130285. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2022.130285

Wang, Z., DeWitt, J. C., Higgins, C. P., & Cousins, I. T. (2017). A Never-Ending Story of Per- and Polyfluoroalkyl Substances (PFASs)? *Environmental Science & Technology*, *51*(5), 2508–2518. https://doi.org/10.1021/acs.est.6b04806

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

Wild, C. P. (2012). The exposome: From concept to utility. *International Journal of Epidemiology*, *41*(1), 24–32. https://doi.org/10.1093/ije/dyr236

Yang, Y., Ok, Y. S., Kim, K.-H., Kwon, E. E., & Tsang, Y. F. (2017). Occurrences and removal of pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in drinking water and water/sewage treatment plants: A review. *Science of The Total Environment*, *596–597*, 303–320. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.04.102

7. Eskerrak eta oharrak

Aurkeztatutako lanaren egileek eskerrak eman nahi dizkiote:

- Espainiar Zientzia eta Berrikuntza Ministerioari, *Kutsatzaile Emergenteekiko Ingurumen- eta Giza-Esposizioa Ebaluatzeko Errendimendu Handiko Estrategia Analitikoak* (AQUASOMIC, Mineco-PID2020-117686RB-C31, 2021-24) proiektuaren bidezko finantziazioagatik.
- Eusko Jaurlaritzari (EJ/GV), Inés Bacieroren eta Mikel Musatadiren diru-laguntzengatik, Doktore Ez Diren Ikertzaileak Prestatzeko Doktoratu Aurreko Programaren barruan (Ikerketa orokorra, 2021-2022 eta 2022-2023).
- Dohaintzan ama-esnea eman duten kideei, ikerketa aurrera eramatea ahalbidetu baitute.

Alteromonas spp. generoko itsas andui baten mekanismo molekular eta zelularrak karbono polimerikoaren degradazioaren parte hartzean

Uxue Arrizabalaga, Carla Pérez-Cruz, Raquel Liébana, Eli Bilbao, Laura Alonso-Sáez

AZTI, Marine Research, Basque Research and Technology Alliance (BRTA), Sukarrieta, Spain.

uarrizabalaga@azti.es

Laburpena

Itsas bakterioek funtsezko zereginak dituzten osagai ugari jariatzen dituzte zelulaz kanpoko ingurunera: exopolisakaridoak, exoentzimak eta mintz-besikulak besteak beste. Osagai horiek parte hartzen dute karbonoaren birmineralizazioan, zelulen arteko komunikazioan eta defentsan. Hala ere, ezezagunak dira oraindik karbonoaren birmineralizazioa gauzatzen duten itsas bakterioen mekanismo zelular eta molekularrak. Artikulu honek *Alteromonadacea* familiako itsas eredu-bakterio baten hazkuntza eta bere elementuen jariapen-ereduak aztertzea du helburu karbono iturri ezberdinak erabilita.

Hitz-gakoak: exoentzima, exopolisakarido, mintz-besikula, *Alteromonadacea,* birmineralizazio.

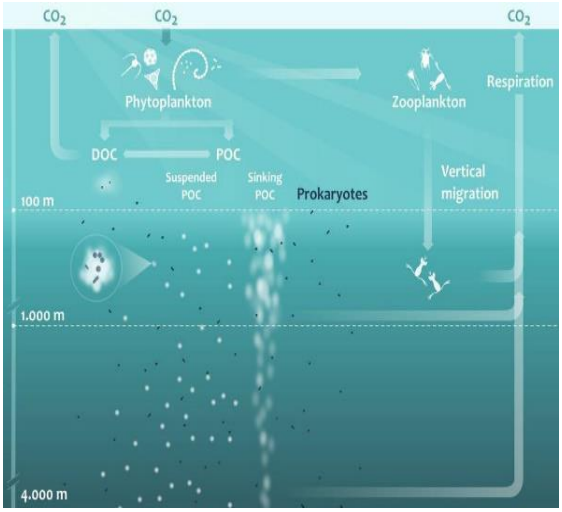
Abstract

Marine bacteria secrete to their extracellular environment a myriad of components which have crucial roles in processes such as carbon remineralization, cell-to-cell communication, and defense. The main elements secreted into the extracellular matrix are exopolysaccharides, exoenzymes, and membrane vesicles, which work together to build a digestive system outside the cell. The molecular and cellular mechanisms of marine bacteria that carry out carbon remineralization are still unknown. This article will focus on characterizing the growth of a marine bacteria from Alteromonadaceae family in different carbon sources and the secretion patterns of the components.

Keywords: Exoenzymes, exopolysaccharides, membrane vesicles, Alteromonadaceae, remineralization.

1. Sarrera eta motibazioa

Ozeanoko karbonoaren (C) zikloa funtsezko bi prozesuren menpe dago. Alde batetik, fitoplanktonak atmosferako CO_2-a finkatzen du C organiko bilakatuz. Prozesu horretan fitoplanktonak C organiko kopuru izugarriak sortzen ditu eta itsas ingurunera isurtzen ditu (Basu eta Mackey, 2018). Beste aldetik, C organiko horren birmineralizazio prozesua gauzatzen dute bakterio heterotrofoek (eta arkeoek): C organikoa degradatzen dute eta sortutako CO_2-a atmosferara itzultzen da (Giering et al., 2017; Guidi et al., 2015). C-aren birmineralizazio prozesua oso aktiboa da, eta fitoplanktonak egunero finkaturiko C-aren %99-a atmosferara itzultzeko gaitasuna daukate bakterio heterotrofoek (Buesseler et al., 2007). Hala ere, gainazalean birmineralizatu ez diren C partikulak itsas hondoan hondoratzen dira, C-aren bahitze-mekanismoa deritzona gertatuz. Itsasoko C organikoaren zati handi bat metatu egiten da makroskopiko bilakatu daitezkeen

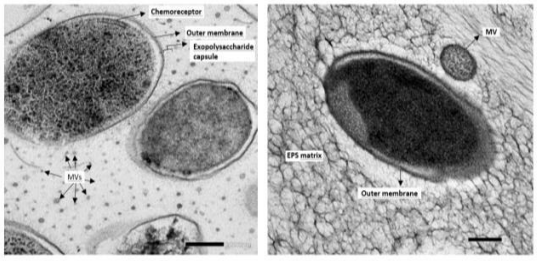


1. irudia. Ozeanoko karbonoaren zikloaren diagrama. Fitoplankotaren finkapen prozesua ageri da CO_2-a karbono organiko eta partikulatua bilakatuz. Bestalde C organikoaren birmineralizazio prozesua erakusten du ur zutabean zehar.

partikula moduan (itsas elurra deritzona), eta bakterioek ingurunera entzima sorta handi bat askatu behar dute makro-partikula horiek degradatu ahal izateko (Guidi et al., 2015; McDonnell et al., 2015).

Bakterioek karbono polimerikoa degradatzeko askatzen dituzten entzimen artean, glikosil hidrolasek (GH) garrantzi handia dute, karbohidratoen loturak hidrolizatzen baitituzte, eta itsas karbono partikulen kopuru handiena karbohidratoz osatuta dago (Kharbush et al., 2020; Simon et al., 2002). GHak entzima oso espezifiko gisa ezagutzen dira, eta hainbat ezaugarriren arabera aldatzen dira, hala nola, degradatzen duten azukre motaren arabera, azukrearen loturen arabera edo lotura horien posizio isometrikoaren arabera (Giordano et al., 2006). Hidrolisi entzimen osotasuna eta jarduera bermatzeko, zelulak exopolisakarido (EPS) eta mintz besikulazko (MB) matrize batean kanporatzen ditu entzima horiek. EPSak bakterioen gainazalean dauden karbohidrato-polimeroak dira eta bakterioen zelulaz kanpoko matrizearen egitura-oinarria osatzen dute. Horrez gain, zelulen atxikimendu prozesuan parte hartzen dute, zelulen arteko interakzioa babesten eta errazten dute eta bakterioak jariatzen dituen elementu desberdinak zelularen inguruan ainguratu eta kontzentratzeko aukera ematen dute (Cowen, 1992). Bestalde, MBak mintz batek inguratzen dituen egitura esferikoak dira. Mintz horren bitartez babesturiko zelula-osagai kontzentratuak ingurunera askatzeko aukera ematen dute, hala nola, hidrolisi entzimak, seinale molekulak edo material genetikoa (DNA, RNA…) (Salvachúa et al., 2020; Schweitzer et al., 2001). Aurrez aipaturiko elementu horiek guztiek elkarrekin lan egiten dute "zelulaz kanpoko digestio-sistema" eraikitzeko eta elikagaien hidrolisia era eraginkorragoan gauzatzeko.

Transmisiozko Mikroskopio Elektronikoa (TEM) erabiliz MareLab-AZTI ikerketa-taldearen aurreko emaitzetan ikusi da partikula kolonizatzaileak diren itsas bakterio ezberdinek zelulaz kanpoko matrize ezberdinak erakusten dituztela exopolisakarido eta mintz besikulen egiturari dagokiola. Beraz, bakterioek egitura konkretu batzuk lehenesten dituzte besteen aurretik zelula kanpoko matrizera jariatzeko, eta hori, C iturri desberdinak degradatzeko gaitasunarekin erlazionatuta egon liteke.



2. irudia. Transmisiozko Mikroskopia Elektronikoaren bidez *Pseudoalteromonas sp*-en isolatuen bistaratzea (ezkerreko irudia) eta *Alteromonas* sp. (eskuineko irudia) itsas agarretan hazita. Beren zelulaz kanpoko matrizean desberdintasun nabariak erakusten dituzten (eskala barra 200 nm-koa da) (Argazkia: L. Alonso-Sáez)

2. Arloko egoera eta ikerketaren helburuak

Orain arte, bakterioek gauzatutako itsas karbono iturri ezberdinen birmineralizazioaren ezagutza *in situ* egindako tasa entzimatikoen neurketatan eta entzima hidrolitikoen analisi molekularretan oinarritu da gehienbat. Hala ere, birmineralizazioa gauzatzeko ematen diren prozesu biologikoak ezezagunak dira.

Lan hau duela gutxi hasitako tesi proiektu baten parte da. Tesi-proiektuaren helburu nagusia partikula kolonizatzaile diren itsas bakterioen matrize degradatzailearen ezaugarriak aztertzea da, baita ezaugarri horien eginkizun funtzionala aztertzea C iturri ezberdinen birmineralizazio prozesuan. Zehazki, zelulaz kanpoko matrizeko elementuen (EPS, MB eta GHak) eginkizuna aztertuko da C polimeriko iturri ezberdinen hidrolisian. Horretarako, birmineralizazio estrategia ezberdinak erabiltzen dituzten eredu bakterioak erabiliko dira. Alde batetik C bulkadak azkar aprobetxatzeko gai diren bakterio jeneralistak (*Alteromonadaceae* familiakoak), eta, bestetik, polimero konplexuen degradazioan espezializaturiko bakterioak (*Planctomycetes* familiakoak).

Zehazki, tesiaren lehen atal honetan, gure ikerketa-taldeak aurrez isolatutako eredu bakterioetako bat (*Alteromonas* sp.) aztertzea erabaki dugu honako helburu hauekin: batetik, itsasoko karbono polimeriko iturri ezberdinetan hazkuntza karakterizatzea, eta, bestetik, C iturri ezberdinetan matrizera jariatzen dituen egiturak karakterizatzea (GH, EPS eta MBak).

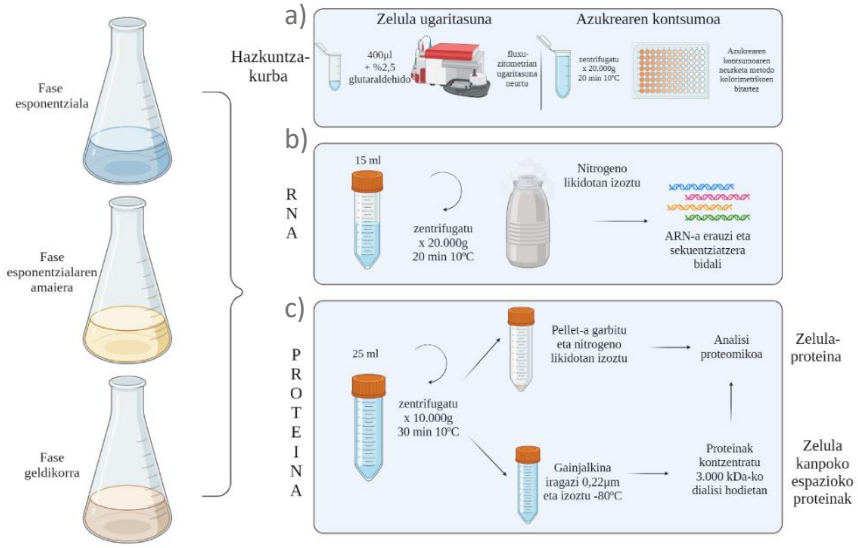
3. Ikerketaren muina

3.1 Materialak eta metodoak

Alteromonas sp. "Tibbles eta Rawling" likido mineralean hazi zen (Tibbles eta Rawlings, 1994), % 0,02 C iturria gehituz eta 20 ºC-tan inkubatu zen ilunpetan eta dardarka (85 rpm). Erabilitako C iturriak laminarina eta alginato polisakaridoak izan ziren, baita glukosa monomeroa ere kontrol gisa. Esperimentuek 3 egun iraun zuten, eta laginak 4 orduko maiztasunarekin hartu ziren (hiru erreplika biologiko gauzatu ziren). Bakterioaren hazkuntza fluxu-zitometria bidez aztertu zen eta polisakaridoen kontsumoa neurtzeko metodo kolorimetrikoak erabili ziren (Dubois et al., 1956).

C iturri ezberdinetan hazkuntza karakterizatu ondoren, hiru interes puntu ezarri ziren laginak hartzeko (fase esponentziala, berantiar-esponentziala eta fase geldikorra). Puntu horietan, transkriptomikarako, zelula proteomikarako eta sekretometarako (zelula kanpoko proteinak), eta EPSa aztertzeko laginak hartu ziren. EPSak zentrifugazio bidez lortu ziren eta zelulen garbiketak dializatu eta kontzentratu ziren 10.000 kDa tamainako dialisi-hodiak erabiliz. Lortutako produktua liofilizatu egin zen.

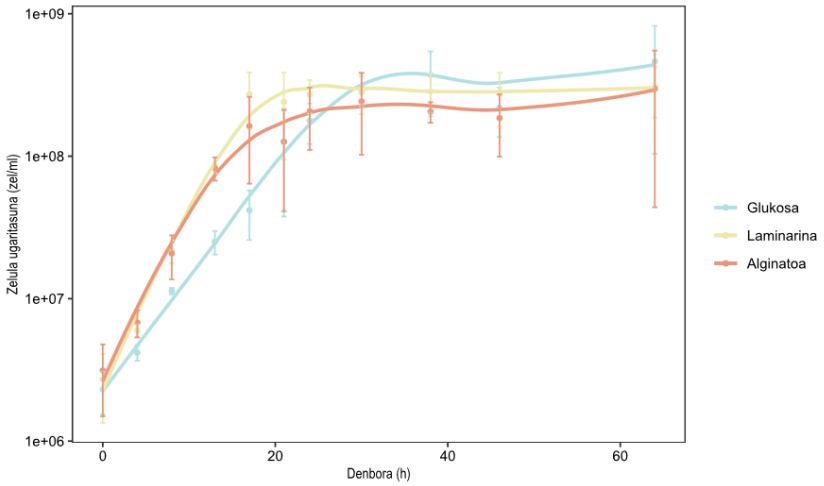
3. irudia. Zelulen transkriptomikarako, proteomikarako eta sekretometarako laginketa-eskema. Ezkerrean, laginketa gauzatu zen *Alteromonas* sp-en kultiboaren hiru faseak. Eskuinaldean lagin-hartze ezberdinen deskribapena ((a) kurbaren jarraipena fluxu-zitometria eta metodo kolorimetrikoen bidez, (b) RNA laginak transkriptomikarako eta (c) Zelula-proteina eta zelulaz kanpoko proteinak (sekretoma) proteomikarako.



3.2. *Alteromonas* sp.-ren hazkuntza- eta kontsumo-kurba C polimeriko iturri ezberdinetan.

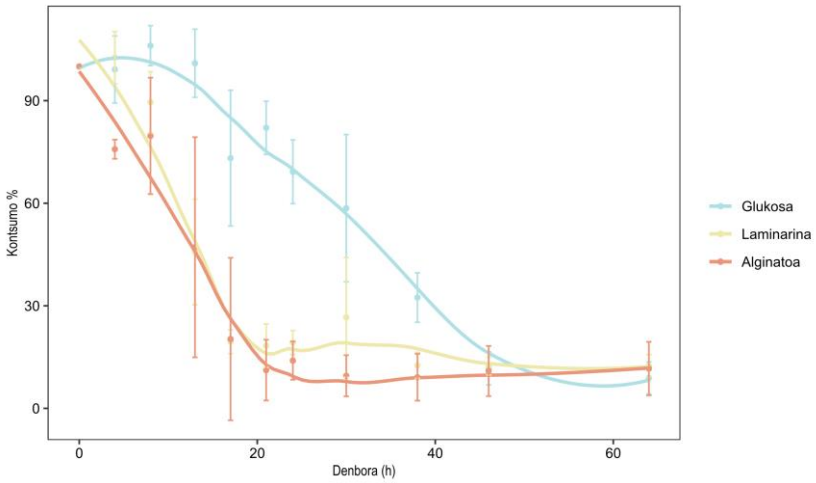
4. irudian C iturriaren araberako hazkuntza-kurben ezberdintasunak azaltzen dira. Hazkuntza geldoagoa da glukosan, laminarina eta alginatoan baino, nahiz eta kasu guztietan ugaritasun antzekoetara iristen den fase geldikorrean. Hazkuntza-tasak antzekoak izan ziren erabilitako polisakaridoentzat (0,27 h^{-1} eta 0,24 h^{-1} laminarina eta alginatoan hurrenez hurren), aldiz, glukosarentzat baxuagoa izan zen (0,15 h^{-1}).

4. irudia. *Alteoromonas spp*-ren hazkuntza-kurba. *Alteromonas* sp-ren zelula ugaritasuna (zelula kopurua/ml) denboran zehar (h) hiru karbono-iturri ezberdinetan (Glukosa, Laminarina eta Alginatoa) beren desbideratze estandarrekin (n=3).



5. irudiak karbono-iturri ezberdinetan azukre-kontsumoaren diferentziak erakusten ditu. Polisakaridoen kontsumoa (laminarina eta alginatoa) glukosarena baino azkarrago gertatzen dela ikusi dugu, horiek monosakaridoaren aurretik guztiz kontsumitzen direlarik (20 eta 48 ordutan hurrenez hurren).

5. irudia. Azukre-kontsumoaren kurba *Alteormonas* sp. *Alteromonas* sp-ren azukre-kontsumoaren ehunekoa (kontsumo %-a) denboran zehar (h) hiru karbono-iturri ezberdinetan (Glukosa, Laminarina eta Alginatoa) beren desbideratze estandarrarekin (n=3).



Alteromonas sp-ren hazkuntza-kurbaren emaitzen arabera, bakterioa gai da polisakarido horiek azkarrago kontsumitzeko monosakaridoa baino. Beraz, *Alteromonas* sp-k polisakaridoen degradaziorako entzima espezifikoak aktibatzeko gaitasuna duela iradokitzen dute emaitzek.

Emaitza horien arabera, laginketarako hiru puntuak aukeratu ziren RNA, zelula proteinak eta sekretoma, eta EPSak isolatzeko. Fase esponentziala 14 h-tan ezarri zen laminarina eta alginatorentzako, eta 21 h-tan glukosaren kasuan. Fase esponentzial-berantiarra 21 h-tan ezarri zen polisakaridoentzat eta 28 h-tan glukosarentzat. Azkenik, fase geldikorreko puntua 36 h-tan eta 48 h-tan ezarri zen polisakaridoentzat eta glukosarentzat hurrenez hurren.

4. **Ondorioak**

Alteromonas sp. itsas polisakaridoen degradazioa aztertzeko eredu bakterio ona da. Alde batetik, bakterioa itsas polisakarido konplexuak (laminarina eta alginatoa) karbono iturri gisa erabilita hazteko gai da. Bestalde, hazkuntza-tasa altuagoa du C iturri gisa polisakaridoak erabiltzean, monosakaridoa erabiltzean baino, polisakaridoen hidrolisirako energia gehiago behar duen arren. Horrek iradokitzen du *Alteromonas* sp. C iturri konplexuen degradazioan espezializatuta dagoela.

5. **Etorkizunerako planteatzen den norabidea**

Aurkeztutako lana *Alteromonas* sp-ek itsas polisakarido ezberdinen degradaziorako erabiltzen dituen mekanismo molekular eta zelularren karakterizaziorako lehen urratsa da. Etorkizunean, karbono-iturri desberdinetan hazten diren bitartean, zelulaz kanpoko matrizearen osagai ezberdinen (GH, MB eta EPSak) adierazpen eta jariapena aztertuko dira. Horretarako, transkriptomika, proteomika eta jariatutako EPSaren analisiak egingo dira. Azkenik, beste partikula kolonizatzaile eredu bakterio batzuekin lanean jarraituko dugu, puntu hauek lantzeko:

1. Itsas bakterio orokor eta espezializatuen genometan EPSen sintesian eta polimeroen hidrolisian (GH) parte hartzen duten gene-multzoen analisi konparatiboa gauzatu.

2. EPS, MB eta GHen jariapenaren karakterizazioa gauzatu eredu bakterio orokor eta espezializatuetan, polisakarido ezberdinetan hazten diren bitartean.

3. Hiru egitura-osagaien (EPS, GH eta MB) elkarrekintza ikusi mikroskopio-teknika desberdinak erabiliz, matrizearen eraikuntzan desberdintasun espazialak zehazteko, karbono polimerikoaren iturri ezberdinei erantzunez.

6. Erreferentziak

Basu, S., eta Mackey, K. R. M. (2018). Phytoplankton as key mediators of the biological carbon pump: Their responses to a changing climate. In *Sustainability (Switzerland)* (Vol. 10, Issue 3). MDPI AG. https://doi.org/10.3390/su10030869

Buesseler, K. O., Lamborg, C. H., Boyd, P. W., Lam, P. J., Trull, T. W., Bidigare, R. R., Bishop, J. K. B., Casciotti, K. L., Dehairs, F., Elskens, M., Honda, M., Karl, D. M., Siegel, D. A., Silver, M. W., Steinberg, D. K., Valdes, J., Mooy, B. Van, eta Wilson, S. (2007). *Revisiting Carbon Flux Through the Ocean's Twilight Zone*. https://doi.org/10.1016/j.pocean.2006.1010.1007

Cowen, J. P. (1992). Marine implications for marine aggregates. *Marine Biology*, *95*, 85–95.

Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., eta Smith, F. (1956). Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Analytical Chemistry*, *28*(3), 350–356. https://doi.org/10.1021/ac60111a017

Giering, S. L. C., Sanders, R., Martin, A. P., Henson, S. A., Riley, J. S., Marsay, C. M., eta Johns, D. G. (2017). Particle flux in the oceans: Challenging the steady state assumption. *Global Biogeochemical Cycles*, *31*(1), 159–171. https://doi.org/10.1002/2016GB005424

Giordano, A., Andreotti, G., Tramice, A., eta Trincone, A. (2006). Marine glycosyl hydrolases in the hydrolysis and synthesis of oligosaccharides. *Biotechnology Journal*, *1*(5), 511–530. https://doi.org/10.1002/biot.200500036

Guidi, L., Legendre, L., Reygondeau, G., Uitz, J., Stemmann, L., eta Henson, S. A. (2015). A new look at ocean carbon remineralization for estimating deepwater sequestration. *Global Biogeochemical Cycles*, *29*(7), 1044–1059. https://doi.org/10.1002/2014GB005063

Kharbush, J. J., Close, H. G., Van Mooy, B. A. S., Arnosti, C., Smittenberg, R. H., Le Moigne, F. A. C., Mollenhauer, G., Scholz-Böttcher, B., Obreht, I., Koch, B. P., Becker, K. W., Iversen, M. H., eta Mohr, W. (2020). Particulate Organic Carbon Deconstructed: Molecular and Chemical Composition of Particulate Organic Carbon in the Ocean. In *Frontiers in Marine Science* (Vol. 7). Frontiers Media S.A. https://doi.org/10.3389/fmars.2020.00518

McDonnell, A. M. P., Lam, P. J., Lamborg, C. H., Buesseler, K. O., Sanders, R., Riley, J. S., Marsay, C., Smith, H. E. K., Sargent, E. C., Lampitt, R. S., eta Bishop, J. K. B. (2015). The oceanographic toolbox for the collection of sinking and suspended marine particles. *Progress in Oceanography*, *133*, 17–31. https://doi.org/10.1016/j.pocean.2015.01.007

Salvachúa, D., Werner, A. Z., Pardo, I., Michalska, M., Black, B. A., Donohoe, B. S., Haugen, S. J., Katahira, R., Notonier, S., Ramirez, K. J., Amore, A., Purvine, S. O., Zink, E. M., Abraham, P. E., Giannone, R. J., Poudel, S., Laible, P. D., Hettich, R. L., eta Beckham, G. T. (2020). Outer

membrane vesicles catabolize lignin-derived aromatic compounds in Pseudomonas putida KT2440. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *117*(17), 9302–9310. https://doi.org/10.1073/pnas.1921073117

Schweitzer, B., Huber, I., Amann, R., Ludwig, W., eta Simon, M. (2001). α- and β-proteobacteria control the consumption and release of amino acids on lake snow aggregates. *Applied and Environmental Microbiology*, *67*(2), 632–645. https://doi.org/10.1128/AEM.67.2.632-645.2001

Simon, M., Grossart, H.-P., Schweitzer, B., eta Ploug, H. (2002). Microbial ecology of organic aggregates in aquatic ecosystems. In *AQUATIC MICROBIAL ECOLOGY Aquat Microb Ecol* (Vol. 28). www.int-res.com

Tibbles, B. J., eta Rawlings, D. J. (1994). Characterization of Nitrogen-Fixing Bacteria from a Temperate Saltmarsh Lagoon, Including Isolates That Produce Ethane from Acetylene. *Microbial Ecology*, 65–80.

7. Eskerrak eta aipamenak

Alde batetik, eskerrak eman MareLab-AZTI ikerketa taldeari, lanaren parte izateagatik eta lan hau garatzeko beharrezko ezagutza eskuragarri uzteagatik. Bestetik, eskerrak eman Eusko Jaurlaritzari tesia gauzatzeko aukera emateagatik.

Nola ezagutu dezakegu gure esposoma?

Mikel Musatadi[1,2], Claudia Caballero[1], Asier Andrés-Maguregi[1], Paula Bustamante[1], Eider Gerekaetxebarria[1], Jon Zumalabe[1], Maitane Olivares[1,2], Olatz Zuloaga[1,2]
Kimika Analitikoa Saila (UPV/EHU) [1], Plentziako Itsas Estazioa (PIE-EHU/UPV) [2]
mikel.musatadi@ehu.eus

Laburpena

Esposoma gizakiok bizitza osoan zehar jasaten ditugun esposizio guztiek osatzen dute. Horien artean, konposatu kimikoekiko esposizioa nabarmendu daiteke. Substantzia kimikoak gure egunerokoan nonahi daude eta etengabeko erabileraren ondorioz, gorputz barrura barnera ditzakegu. Gorputzean ematen diren erreakzio metabolikoen ondorioz, konposatuak eraldatu eta gernutik kanporatu ohi dira. Hori dela eta, gernua esposoma aztertzeko jariakin interesgarria da. Lan honetan, konposatu kimikoen bi familia (disruptore endokrinoak eta konposatu mugikor eta iraunkorrak) eta hauen metabolitoak gernuan analizatzeko metodo analitikoak deskribatzen dira likido kromatografia-masa espektrometria erabilita.

Hitz gakoak: esposoma, konposatu kimikoak, gernua, prozedura analitikoak, likido kromatografia, masa espektrometria

Abstract

The exposome is the collection of all exposures we suffer throughout our lifespan. Precisely, the exposure to chemicals can be highlighted. Chemicals are present everywhere in our daily lives, and due to their constant use, they can be introduced to our bodies. Within our bodies, chemicals are metabolized and excreted through urine. Consequently, urine is a very interesting biological fluid for understanding the exposome. In this work, analytical methods for analyzing two chemical families (endocrine disruptors and persistent and mobile compounds) are described by means of liquid chromatography-mass spectrometry.

Keywords: exposome, chemicals, urine, analytical methods, liquid chromatography, mass spectrometry

1. Sarrera eta motibazioa

Gaixotasunen etiologia ezagutu nahian, erabat beharrezkoa da gizakion genetika ezagutzeaz gain, gure ingurumena tentuz aztertzea. Izatez, ingurugiroak gaixotasun kronikoen hiru laurden batekin zerikusia duela erakutsi dute ikerketek (Viet et al., 2021). Testuinguru horretan, esposomaren paradigma plazaratu zuen Wild ikertzaileak 2005ean eta, gaur egun, banako batek bizitza osoan zehar jasaten dituen esposizioen bilduma bezala defini daiteke (Jamnik et al., 2022). Beraz, gizakion esposoma karakterizatu ahal izateko, ikerketa holistikoek ingurugiro- eta barne-faktoreak, eta hauei dagozkien erantzun biologikoak ikertu behar dituzte. Hala ere, ekimen horrek aztertu behar dituen ingurugiro-faktoreak anitzak dira, kanpo-inguruko esposizio orokorraz gain (klima, erradiazioa, giro urbanoa eta abar), pertsona bakoitzaren bizimoduarekin lotuta dauden esposizioak ere kontuan hartu behar direlako; hala nola, ohiturak, dieta, etxebizitza pertsonala edota estresa (Andra et al., 2017; Jobst & Godri Pollitt, 2020).

Esposizio eta faktore gehienen atzean, konposatu kimikoak ezkutatzen dira. Gizakiok iraultza industrialetik aurrera sintetizatu ditugun substantzia kimikoak asko diren arren, erregistratuta dauden 120 milioi substantzia kimikoen artean, % 0,1 baino gutxiago daude toxiko bezala identifikatuta (Andra et al., 2017). Gainera, Europar Batasunak ingurumenaren eta gizakion ongizatea bermatzeko hainbat konposatu kimiko debekatu edo arautu dituen arren, egungo legedia lausoa dela esan daiteke. Izan ere, ez ditu konposatu kimikoen familia guztiak, ezta horien eraldaketa-produktuak, edota isuri-iturri alternatiboak kontuan hartzen (Caballero-Casero et al., 2021). Ondorioz, 30000 substantzia kimiko ezagun baino gehiago ohikoak dira gure eguneroko bizitzan. Adibidez, konposatu kimiko organikoak dira nagusi plastikoetan, zaintza pertsonalerako produktuetan, farmakoetan, itsaspenaren aurkako agenteetan, biozidetan, erreketa-produktuetan, zein suaren atzeratzaileetan (Andra et al., 2017).

Konposatu organiko anitz horiekin uneoro kontaktua izanik, gure gorputzera sar daitezke aho-bidetik, arnastuta, zein azaletik xurgatuta (Calafat et al., 2010). Terminologiaren ikuspuntutik, gorputzean naturalki aurkitzen ez diren eta kanpotik barneratu diren substantziei xenobiotiko deritze ("xeno" kanpotar, "bio" bizitza). Gorputz barruan, xenobiotikoek ibilbide desberdinak jarrai ditzakete bakoitzaren ezaugarri fisiko-kimikoen arabera. Oro har, behin barneratuta odolaren bidez barreiatzen dira. Xenobiotiko ez-polarren joera, gorputzeko matrize lipidikoagoetan metatzea da eta, hortaz, odolean bertan, bular-esnean, zein gantzetan aurki daitezke. Xenobiotiko polarren kasuan, ordea, urarekiko daukaten afinitatearen ondorioz, gernura heldu eta bertatik kanporatu ohi dira (Asimakopoulos et al., 2016; Hallberg et al., 2021; Nickerson, 2006).

Hala ere, giza gorputzak estrategia desberdinak dauzka gorputzean metatu diren xenobiotikoak kanporatzeko, zehazki, gibelean ematen diren lehen eta bigarren faseko erreakzio metabolitoak direlakoak. Lehen faseko erreakzio nagusiak, jatorrizko konposatuaren oxidazioa, erredukzioa eta hidrolisia dira. Horien ondorioz, xenobiotikoa polarragoa den metabolito batera eraldatzen da. Bigarren faseko erreakzioan, ordea, konjugazio-erreakzio bat gertatzen da, hots, jatorrizko xenobiotikoari edo lehen faseko metabolitoari oso polarra den talde bat gehitzen zaio, nagusiki, glukuronidoa, baina baita sulfato edo glizina taldeak ere. Ondorioz, uretan disolbagarria den metabolitoa lortzen da gernuaren bitartez kanporatzeko helburuarekin. Esandako guztiagatik, gernua esposoma aztertzeko jariakin interesgarria da (Lu & Xue, 2019).

2. Arloko egoera eta ikerketaren helburuak

Esposomaren deskodetzearen erronkan, kimika analitikoaren zeregin nagusia giza jariakinetan xenobiotikoak eta horien metabolitoak analizatzeko metodo sendoak garatzea da. Izan ere, gizakiok jasaten ditugun esposizioak hobeto ezagututa, egun martxan dauden biomonitorizazio-programak indartu daitezke eta, ildo horretatik, konposatu kimikoak arautu eta erregulatzen dituzten legeak eta politikak definitu.

Konposatu xenobiotikoen artean, disruptore endokrinoak direlakoak (EDC-ak, ingeleseko *Endocrine Disrupting Compounds*) arreta berezia bereganatu dute izaki bizidunen sistema endokrinoan daukaten eragina dela eta. EDC-ak, hormonen produkzioan, askapenean, garraioan, metabolismoan edota ekintza biologikoan eragina izan dezaketen konposatu kimikoak dira. Adibidez, garapen neuronalean eragin dezakete edota ugalkortasuna murriztu. Talde heterogeneo honen barruan aurki daitezke plastikoaren industrian eta zaintza pertsonaletarako produktuetan oso erabiliak diren parabenoak, ftalatoak, bisfenolak, edota bentzofenonak (Kahn et al., 2020).

Hala ere, egun abian dauden biomonitorizazio-programetan jarraitzen diren xenobiotiko organiko gehienak ez-polarrak edo erdi-polarrak izan ohi dira. Konposatu oso polarrak eta ionikoak, ordea, alde batera uzten dira euren analisiak suposatzen duen zailtasuna dela eta. Konposatu polarrak eta ionikoak ere kontuan hartu beharko lirateke esposomaren azterketa osoa egin ahal izateko, batez ere, matrize urtsuetan. Izan ere, aldez aurretik aipatutako metabolito polarrez gain, bestelako ingurumeneko kutsatzaile polar eta ionikoen menpe ere egon gaitezke ikerketa desberdinek erakutsi dutenaren arabera (Reemtsma et al., 2016; Schulze et al., 2019). Konposatu polarrak eta ionikoak uretan oso disolbagarriak izanik, erraz barreiatzen dira ingurumeneko uretan zehar. Horietako batzuk, gainera, iraunkorrak dira eta, hortaz, ez dira ezabatzen ohiko araztegiko eliminazio-prozesuetan. Ondorioz, edateko uretara hel daitezke eta gizakion ongizatea arriskuan jarri nolabaiteko toxikotasuna badute. Konposatu multzo hori konposatu iraunkor eta mugikor bezala (PMOCs, ingeleseko *Persistent and Mobile Organic Compounds*) ezagutzen da gaur egun komunitate zientifikoan (Montes et al., 2019).

PMOCs konposatuen analisian dagoen erronka nagusiena euren polaritatearekin lortuta dator. Izan ere, ez dira ondo banatzen ohiko alderantzizko faseko likido-kromatografiaren bidez eta, hortaz, euren aldibereko analisia zaila da. Hori konpontzeko, estrategia bat modu mistoko kromatografia erabiltzea da. Hurbilketa horretan, pH-a funtsezko faktore bilakatzen da zutabe kromatografikoak eta analitoek kontrako karga izan dezaten eta, ondorioz, elkarrekintza ioniko bidez zutabera atxiki daitezen. Ildo beretik, PMOCs konposatuak oso polarrak izanik, nekez

erauzi daitezke gernutik. Beraz, azken urteotako joera gernu-laginen diluzioa eta neurketa zuzena egitea izan da (DS, ingeleseko *Dilute and Shoot*). Prozedura horrekin, nahiz eta diluzioaren eta garbiketa ezak suposa dezakeen matrize-efektuaren ondorioz kontzentrazio baxuetako xenobiotikoak ez detektatzea gerta daitekeen, ez dago PMOCs-en galerarik prozedura analitikoan (Hale et al., 2022).

Analisi kimikoan, hurbilketa desberdinak daude helburuaren arabera. Aztertu nahi den konposatuen zerrenda ezaguna eta mugatua denean, analisi bideratu bidezko metodoak erabiltzen dira. Metodo horietan, giza jariakin eta intereseko konposatuen (analitoen) ezaugarriak kontuan izanda, laginaren tratamendu sakonak egin ohi dira analitoak matrizetik isolatzeko. Horrela, tratamendu osteko analisian egon daitezkeen interferentziak minimizatzen dira. Analisi horri dagokionez, konposatu organikoetarako detektagailu bati akoplatutako banaketa teknika kromatografikoak dira erabilienak. Detektagailuen inguruan, bereizmen baxuko masa-espektrometria (MS) da erabiliena eskaintzen dituen abantailak direla eta, hala nola, analitoen kuantifikaziorako beharrezkoak diren sentikortasun eta selektibitate altuak (Pourchet et al., 2020).

Hala ere, esposomikako testuinguruan, konposatuen zerrenda oso luzea eta, askotan, ezezaguna izan daiteke, batez ere, aurretiaz aipatutako metabolitoak kontuan hartzen badira. Hortaz, analisi ez-bideratuko hurbilketak egokiagoak dira esposoma ezagutu nahi baldin bada. Kasu horietan, laginaren tratamendu xumea hobesten da, ezaugarri fisiko-kimiko desberdinak dituzten xenobiotikoak galdu ez daitezen. Analisian, ordea, guztiz beharrezkoa da bereizmen altuko masa-espektrometria (HRMS) ezagunak ez diren substantziak identifikatu ahal izateko. Testuinguru honetan, ikerketa honen helburua natura eta erabilera askotariko xenobiotikoak eta horien metabolitoak gernuan analizatzeko metodo bideratuen eta ez-bideratuen garapena da.

3. Ikerketaren muina

Lan honen muina hiru atal nagusitan banatzen da; hala nola, (1) disruptore endokrinoen analisi bideratua eta ez-bideratua, (2) konposatu mugikor eta iraunkorren determinazioa, eta (3) bigarren faseko metabolitoen jarraipena.

3.1 Disruptore endokrinoen analisi bideratua eta ez-bideratua gernuan

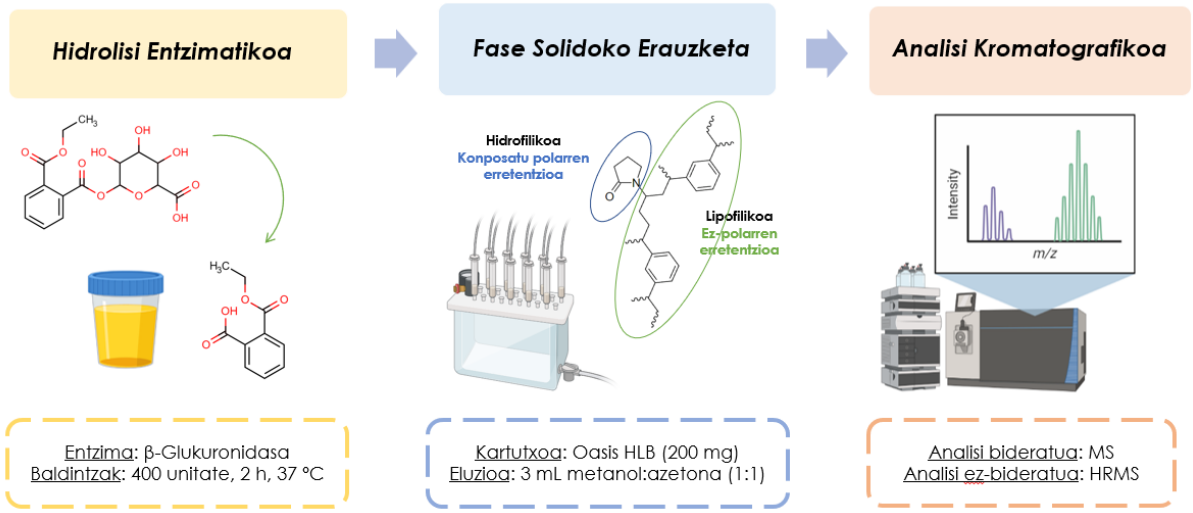
Familia desberdinetako 24 EDC (parabenoak, bentzofenonak, ftalatoak, bisfenolak eta bakterizidak) gernuan determinatzeko, 1. irudian laburbiltzen den prozedura analitikoa garatu dugu (Musatadi et al., 2022). Laburki, gernu laginen hidrolisi entzimatikoa egiten da β-glukuronidasa entzima erabilita. Horrela, bigarren faseko glukuronidoen apurketa ematen da jatorrizko xenobiotikoa kuantifikatzeko helburuarekin. Izan ere, kuantifikaziorako estandarrak beharrezkoak dira eta glukuronidoen estandar gutxi batzuk bakarrik daude salgai. Behin hidrolisia bukatuta, gernuko interferentziak baztertzeko (nagusiki ioiak eta gatzak) fase solidoko erauzketa (SPE, ingeleseko *Solid Phase Extraction*) garbiketa-teknika erabili da Oasis HLB kartutxo polimerikoak erabilita. Azkenik, laginen analisi bideratua eta ez-bideratua alderantzizko faseko likido-kromatografiari lotutako bereizmen baxuko eta altuko masa-espektrometriaren bidez aurrera eraman da (LC-MS eta LC-HRMS), hurrenez hurren.

Garatutako metodoa, lau bolondresen gernu laginetan aplikatu dugu, alde batetik, analisi bideratuaren bitartez 24 EDCen kontzentrazioak determinatzeko, eta bestetik, analisi ez-bideratuaz baliatuta bestelako xenobiotikoak bilatzeko. Analisi bideratuari dagokionez, 24 EDCtik 16 kuantifikatu ditugu, kontzentrazio altuenetan ondorengo konposatuak aurkitu ditugularik: ultramore iragazkietan dagoen bentzofenona-3 (0,2–13 ng/mL), plastikoen industrian erabiltzen diren A bisfenola (7,7–13,7 ng/mL) eta mono butil ftalatoa (2–17 ng/mL), metil 3,5-dihidroxibentzoato (8–254 ng/mL) parabenoa, eta triklosan bakterizida (0,3–9 ng/mL). Aipagarria da, konposatu hauek produktu kosmetikoak egunero erabiltzen dituen bolondresean determinatu direla kontzentrazio handienean.

Analisi ez-bideratuan, bi hurbilketa jarraitu ditugu; alde batetik, esposomarekin zerikusia duten 3000 xenobiotikoren zerrenda erabilita eta, bestetik, bilaketa mugatzea kloro, bromo edo sufre

atomoak dituzten konposatuetara. Lehen hurbilketaren bitartez, 33 xenobiotiko gehigarri bilatu ditugu, elikagaiekin eta gure elikadurarekin zerikusia dutenak (gozagarri artifizialak eta kafeina bezalako estimulatzaileak) batez ere, baina baita bizimoduarekin elkarlotzen direnak ere. Adibide gisa, nikotinaren metabolitoa den kotinina, edota parazetamol farmakoa. Bigarren estrategia erabilita, 4 xenobiotiko gehigarri detektatu ditugu, bestek beste, hotzeriaren sintomen aurkako farmakoak.

1. irudia. EDC-ak gernuan determinatzeko prozedura analitikoaren laburpena.



3.2 Konposatu iraunkor eta mugikorren determinazioa gernuan

Propietate kimiko desberdinetako eta familia askotariko 33 PMOCs gernuan determinatzeko, 5 gernu errealen nahastea azetonitriloarekin diluitu eta modu mistoko likido-kromatografiari lotutako bereizmen baxuko masa-espektrometriaren bidez analizatu dugu (MMLC-MS). Kuantifikatuko konposatuen artean, kontzentrazio altuenetan (200 ng/mL gernuan), akrilamida, aspartamoa eta azido 6-kloropiridin-3-karboxilikoa determinatu ditugu. Akrilamida, polimeroen sintesian erabiltzeaz gain, karbohidratoetan aberatsak diren jakiak berotzean sortzen den albo-produktu bat da ere. Gainera, tabakoaren kean ere aurki daitekeen substantzia da. Aspartamoa, elikagai askotan dagoen gozagarri artifiziala da, eta azido 6-kloropiridin-3-karboxilikoa, ordea, pestizida neonikotenoideen metabolitoa.

Kontzentrazio baxuagoetan determinatu ditugun PMOCs-en artean, amonio glufosinato herbizida eta S bisfenola aipa daitezke. Geroz eta ohikoagoa da giza laginetan S bisfenola neurtzea merkatuan debekatutako A bisfenolaren alternatiba gisa erabiltzen delako (*All News - ECHA*). Horrelako konposatu polarrak giza laginetan aurkitu izanak konposatu kimikoen erregulazioan lagundu beharko luke etorkizunean.

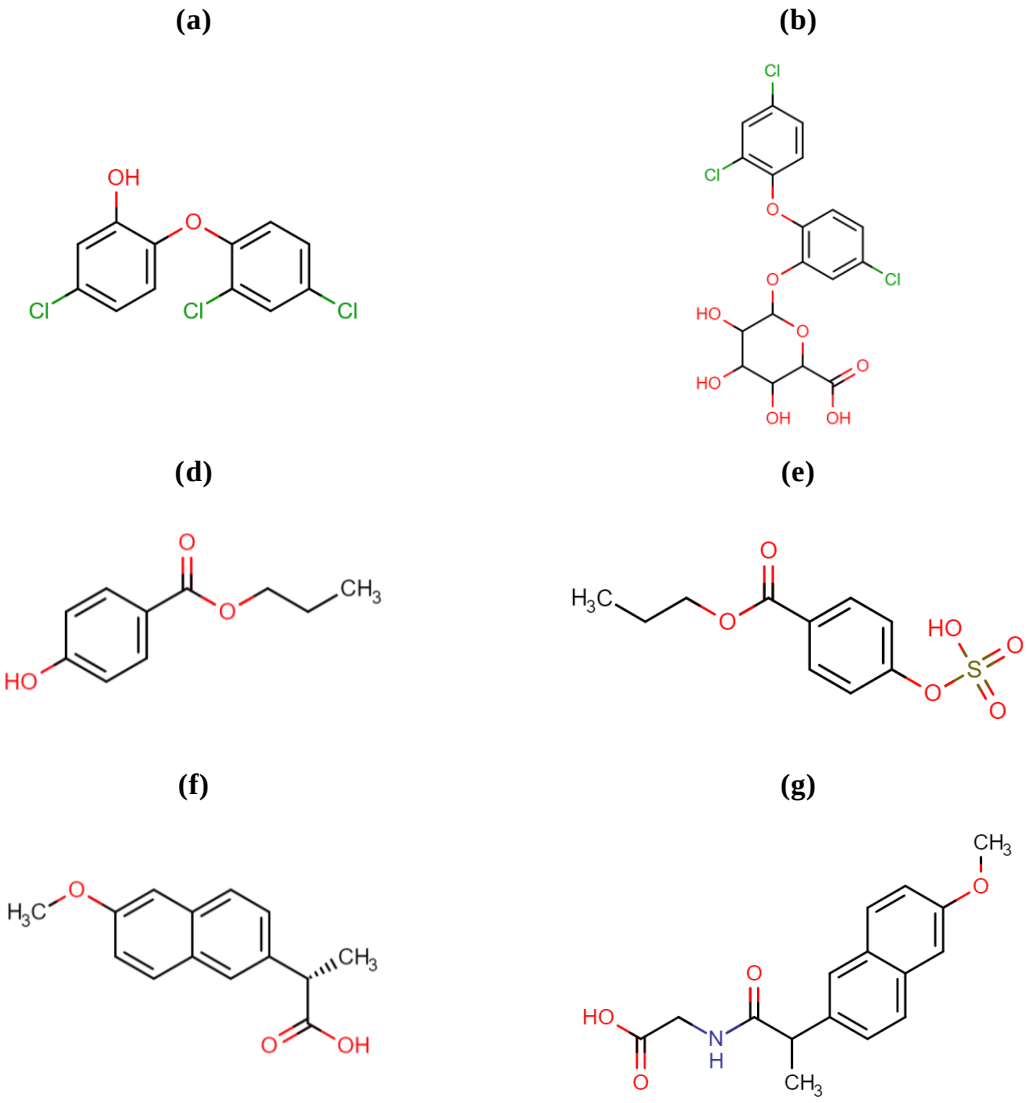
3.3 Xenobiotikoen bigarren faseko metabolitoen identifikazioa gernuan

Aurreko ataletan gernuan egon daitezkeen jatorrizko xenobiotikoen determinazioa egin baldin badugu ere, posible da bigarren faseko metabolitoen jarraipena egitea bereizmen altuko masa-espektrometriari esker. Horretarako, lan honetan esposomarekin zerikusia duten kutsatzaileen zerrenda baten bigarren faseko metabolitoak (glukuronidoak, sulfatoak eta glizinak) simulatu ditugu BioTransformer 3.0 programa erabilita. Laginaren tratamenduari dagokionez, hiru prozedura frogatu ditugu oso desberdinak izan daitezkeen metabolitoak aldi berean identifikatzeko. Aurreko ataletan erabilitako SPE eta DS protokoloez gain likido-likido erauzketa (LLE) ere erabili dugu. Azken horretan, etil azetatoa gatzekin eta gatz gabe, eta azetonitriloa gatzekin frogatu ditugu erauzle gisa. Izan ere, gatzek ur-fasea asetu eta konposatuen erauzketa fase organikora faboratua egon daiteke. Horretarako, hidrolizatu gabeko eta entzimarekin

hidrolizatutako 5 gernu lagin prozedura analitiko desberdinekin (5 guztira) tratatu ditugu eta UHPLC-HRMS bidez neurtu.

Hidrolizatu gabeko laginetan identifikatutako metabolitoak direla eta, 58 glukuronido, 32 sulfato eta 24 glizina identifikatu ditugu gernu-laginetan. Eraldaketa-produktu horien artean, erabilera pertsonalerako produktuetan dauden metil eta propil parabenoen, hanturaren aurkako naproxeno farmakoaren, edota aurretiaz aipatutako triklosan bakterizidaren metabolitoak identifikatu ditugu (2. irudia). Bestalde, laginaren tratamenduari dagokionez, SPE bidez LLE eta DS teknikekin baino konposatu gehiago identifikatu ahal izan ditugu. Ondorio hau garrantzitsua da biomonitorizazio lanetarako, izan ere, ehunka lagin analizatu behar badira beharrezkoa da aurretratamendurako teknika bakarra erabiltzea.

2. irudia. Gernuan identifikatu ditugun xenobiotikoak eta euren metabolitoak: (a) triklosana, (b) triklosan glukuronidoa, (d) propil parabenoa, (e) propil paraben sulfatoa, (f) naproxenoa eta (g) naproxeno-glizina.



Konposatu horien jatorrizko xenobiotikoak hidrolizatutako laginetan ere determinatu baldin baditugu ere, beste hainbat konposatu bakarrik determinatu ahal izan dira metabolito gisa. Adibide bat emateko, ibuprofenoaren glukuronidoa identifikatu dugu hidrolisi entzimatikoa egin ez den gernu lagin batean. Hala ere, hidrolisia aplikatu den bolondres bereko laginean ezin izan dugu ibuprofenoa determinatu. Izan ere, metabolito askoren, batez ere, glukuronidoen eta sulfatoen ionizazio-ahalmena dela eta, seinale analitiko intentsuagoa lortzen da, eta hortaz, identifikazio ziurra egiteko kalitate hobeko masa espektroa.

4. Ondorioak

Lan honetan aztertu ahal izan dugun bezala, gizakiok konposatu kimikoen zerrenda amaigabe baten eraginpean gaude. Izan ere, konposatu horiek zeintzuk diren ezagutzeko egindako gernuaren analisi kimikoek, bai jatorrizko xenobiotikoen, bai euren metabolitoen presentzia erakutsi dute. Oro har, SPE bidezko laginaren tratamenduak emaitza interesgarriak eman ditu. Laginen hidrolisia eginda eta LC-MS bidezko detekzioari esker, maila baxuko EDC-ak kuantifikatu ahal izan dira. Hala ere, HRMS-ri esker, ohiko jarraipen zerrendetatik at dauden beste hainbat xenobiotiko identifikatu dira. Gainera, hidrolisi entzimatikoa egin ez den laginetan bigarren faseko metabolitoak ere identifikatu ahal izan dira, esposomaren inguruko informazio gehigarria jasoz. Hala ere, DS bezalako laginaren diluzioak, SPE bidezko tratamenduan galdu daitezkeen xenobiotiko oso polar eta ionikoen, hots, PMOCs-en, determinazioa ahalbidetzen duela ikusi da. Kasu horretan, modu mistoko likido-kromatografiaren abantailak agerian geratu dira ere eta MMLC ohiko alderantzizko faseko kromatografiaren osagarri dela esan daiteke.

5. Etorkizunerako planteatzen den norabidea

Esposoma guztiz deskodetzea ezinezkoa baldin bada ere, hobeto ulertzeko beharrezkoa da giza jariakin desberdinetan xenobiotikoak eta horien metabolitoak analizatzeko metodoak garatzea. Horren inguruan, bestelako kasu interesgarri batzuk dira giza listua, plasma edota jariakin folikularra. Listuan, nagusiki ura izanik, zentzuzkoa litzateke PMOCs-en analisia egitea, batez ere, gernuan baino interferentzia ioniko gutxiago espero direlako. Gernuari dagokionez, hurrengo erronka kutsatzaile organiko iraunkor hidroxilatuen jarraipena egitea da, likido-kromatografiatik gas-kromatografiara salto eginda. Azkenik, plasma eta jariakin folikularra ere kutsatzaileen gordailu izanik, analisi metodo bideratu eta ez-bideratuak garatzea beharrezkoa da. Horrela, metodo guztien bitartez, esposoma miatzen jarrai dezakegu.

6. Erreferentziak

All news—ECHA. (n.d.). Sarrera: Urtarrilaren 31, 2023. https://echa.europa.eu/-/bpa-being-replaced-by-bps-in-thermal-paper-echa-survey-finds

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

Asimakopoulos, A. G., Xue, J., De Carvalho, B. P., Iyer, A., Abualnaja, K. O., Yaghmoor, S. S., Kumosani, T. A., & Kannan, K. (2016). Urinary biomarkers of exposure to 57 xenobiotics and its association with oxidative stress in a population in Jeddah, Saudi Arabia. *Environmental Research*, *150*, 573–581. https://doi.org/10.1016/j.envres.2015.11.029

Caballero-Casero, N., Belova, L., Vervliet, P., Antignac, J.-P., Castaño, A., Debrauwer, L., López, M. E., Huber, C., Klanova, J., Krauss, M., Lommen, A., Mol, H. G. J., Oberacher, H., Pardo, O., Price, E. J., Reinstadler, V., Vitale, C. M., van Nuijs, A. L. N., & Covaci, A. (2021). Towards harmonised criteria in quality assurance and quality control of suspect and non-target LC-HRMS analytical workflows for screening of emerging contaminants in human biomonitoring. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, *136*, 116201. https://doi.org/10.1016/j.trac.2021.116201

Calafat, A. M., Ye, X., Wong, L.-Y., Bishop, A. M., & Needham, L. L. (2010). Urinary Concentrations of Four Parabens in the U.S. Population: NHANES 2005–2006. *Environmental Health Perspectives*, *118*(5), 679–685. https://doi.org/10.1289/ehp.0901560

Hale, S. E., Neumann, M., Schliebner, I., Schulze, J., Averbeck, F. S., Castell-Exner, C., Collard, M., Drmač, D., Hartmann, J., Hofman-Caris, R., Hollender, J., de Jonge, M., Kullick, T., Lennquist, A., Letzel, T., Nödler, K., Pawlowski, S., Reineke, N., Rorije, E., … Arp, H. P. H. (2022). Getting in control of persistent, mobile and toxic (PMT) and very persistent and very mobile (vPvM) substances to protect water resources: Strategies from diverse perspectives. *Environmental Sciences Europe*, *34*(1), 22. https://doi.org/10.1186/s12302-022-00604-4

Hallberg, I., Plassmann, M., Olovsson, M., Holte, J., Damdimopoulou, P., Sjunnesson, Y. C. B., Benskin, J. P., & Persson, S. (2021). Suspect and non-target screening of ovarian follicular fluid and serum – identification of anthropogenic chemicals and investigation of their association to fertility. *Environmental Science: Processes & Impacts*, *23*(10), 1578–1588. https://doi.org/10.1039/D1EM00211B

Jamnik, T., Flasch, M., Braun, D., Fareed, Y., Wasinger, D., Seki, D., Berry, D., Berger, A., Wisgrill, L., & Warth, B. (2022). Next-generation biomonitoring of the early-life chemical exposome in neonatal and infant development. *Nature Communications*, *13*(1), Article 1. https://doi.org/10.1038/s41467-022-30204-y

Jobst, K. J., & Godri Pollitt, K. (2020). Editorial overview: Exposomics, emerging exposures and analytical challenges. *Current Opinion in Environmental Science & Health*, *15*, A1–A3. https://doi.org/10.1016/j.coesh.2020.08.001

Kahn, L. G., Philippat, C., Nakayama, S. F., Slama, R., & Trasande, L. (2020). Endocrine-disrupting chemicals: Implications for human health. *The Lancet Diabetes & Endocrinology*, *8*(8), 703–718. https://doi.org/10.1016/S2213-8587(20)30129-7

Lu, J.-D., & Xue, J. (2019). Poisoning. In *Critical Care Nephrology* (pp. 600-629.e7). Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-0-323-44942-7.00101-1

Montes, R., Rodil, R., Cela, R., & Quintana, J. B. (2019). Determination of Persistent and Mobile Organic Contaminants (PMOCs) in Water by Mixed-Mode Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry*, *91*(8), 5176–5183. https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b05792

Musatadi, M., Caballero, C., Mijangos, L., Prieto, A., Olivares, M., & Zuloaga, O. (2022). From target analysis to suspect and non-target screening of endocrine-disrupting compounds in human urine. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. https://doi.org/10.1007/s00216-022-04250-w

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

Pourchet, M., Debrauwer, L., Klanova, J., Price, E. J., Covaci, A., Caballero-Casero, N., Oberacher, H., Lamoree, M., Damont, A., Fenaille, F., Vlaanderen, J., Meijer, J., Krauss, M., Sarigiannis, D., Barouki, R., Le Bizec, B., & Antignac, J.-P. (2020). Suspect and non-targeted screening of chemicals of emerging concern for human biomonitoring, environmental health studies and support to risk assessment: From promises to challenges and harmonisation issues. *Environment International*, *139*, 105545. https://doi.org/10.1016/j.envint.2020.105545

Reemtsma, T., Berger, U., Arp, H. P. H., Gallard, H., Knepper, T. P., Neumann, M., Quintana, J. B., & Voogt, P. de. (2016). Mind the Gap: Persistent and Mobile Organic Compounds—Water Contaminants That Slip Through. *Environmental Science & Technology*, *50*(19), 10308–10315. https://doi.org/10.1021/acs.est.6b03338

Schulze, S., Zahn, D., Montes, R., Rodil, R., Quintana, J. B., Knepper, T. P., Reemtsma, T., & Berger, U. (2019). Occurrence of emerging persistent and mobile organic contaminants in European water samples. *Water Research*, *153*, 80–90. https://doi.org/10.1016/j.watres.2019.01.008

Viet, S. M., Falman, J. C., Merrill, L. S., Faustman, E. M., Savitz, D. A., Mervish, N., Barr, D. B., Peterson, L. A., Wright, R., Balshaw, D., & O'Brien, B. (2021). Human Health Exposure Analysis Resource (HHEAR): A model for incorporating the exposome into health studies. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, *235*, 113768. https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2021.113768

7. Eskerrak eta oharrak

Lan hau Eusko Jaurlaritzako Hezkuntza Sailaren eta Espainiar Estatuko Zientzia eta Berrikuntza Ministerioaren finantzazioei esker eraman da aurrera, IT-1446-22 ikerketa talde kontsolidatuari eta PID2020-117686RB-C31 proiektuari esker, hurrenez hurren. Halaber, Mikel Musatadik Eusko Jaurlaritzako Doktoratu Aurreko Programako beka jaso izana eskertu nahi du. Eider Gerekaetxebarriak eta Paula Bustamantek, ordea, Eusko Jaurlaritzako Ikasiker lankidetza beka.

Axioi Inflazioa

Daniel G. Figueroa[1], Joanes Lizarraga[2,3], Ander Urio[2,3], Jon Urrestilla[2,3]

[1] Instituto de Física Corpuscular (IFIC), Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) eta Universitat de València, 46980, Valentzia
[2] Fisika saila, Euskal Herriko Unibertsitatea, UPV/EHU, 48080, Bilbo
[3] EHU Quantum Center, Euskal Herriko Unibertsitatea, UPV/EHU

ander.urio@ehu.eus

Laburpena

Lan honetan axioi inflazio ereduaren dinamika ez-lineala ikertu dugu. Horretarako *gauge* eremuek inflatoiaren dinamikan eragiten duten erreakzioa aztertu dugu, eta tresna gisa *lattice* simulazioak erabili ditugu, askatasun gradu guztiak aldi berean eboluzionatuta. Gainera, lortutako emaitzak lehendik zeudenekin konparatu ditugu, non azken hauek hurbilketa analitikoak erabilita eta efektu inhomogeneoak ekidinda lortuak diren. Inflazioaren dinamika era egokian deskribatzeko ekuazio inhomogeneoak bere osotasunean kontsideratu behar direla ondorioztatzen dugu, eta, beraz, beharrezkoa dela fenomenologiako muga eta emaitzak birkalkulatzea.

Hitz gakoak: Kosmologia, unibertso goiztiarra, axioi inflazioa, dinamika ez-lineala

Abstract

We have studied the non-linear dynamics of the axion-inflation model. The analysis is based on how the gauge fields backreact on the inflaton dynamics by using lattice simulations, where we simulate all degrees of freedom simultaneously. In addition, we have compared the results from our lattice simulations with those that use analytical approximations and where inhomogeneous effects are neglected. We conclude that in order to correctly describe the inflationary dynamics, it is crucial to consider the full inhomogeneous equations, and it is necessary to recalculate the current bounds and constraints from the phenomenology.

Keywords: *Cosmology, early universe, axion inflation, non-linear dynamics*

1 Sarrera eta motibazioa

Egun behatzen dugun unibertsoa eta ordura arteko bilakaera era egoki batean deskribatzen du *Big Bang* edo hasierako singularitatearen ereduak. Einsteinen erlatibitate orokorra oinarri gisa hartuta, unibertsoaren geometriaren eta edukiaren arteko elkarrekintza posible da azaltzea. Are gehiago, fenomeno txundigarri askoren izaera deskribatzeko tresna aparta da; horien artean, zulo beltzak eta grabitazio-uhinak.

Dena den, *Big Bang* eredua arrakastatsua izan arren, ez da gai hainbat fenomeno fisikori azalpena emateko. Adibide argiena Hondoko Mikrouhin Erradiazioa (CMB siglak ingelesez) dugu; hein handi batean *Big Bang* ereduaren mugak erakusten ditu eta. CMBa hasierako singularitatetik 300.000 urte igaro eta gero libreki bidaiatu zuten fotoien hondo ia uniformea da. Hala ere, hondoaren uniformetasun hori soilik eskala handietan behatu daiteke; anisotropiak daude CMBan eta jatorria ulertzeko beharrezkoa da haratago joatea.

Anisotropia horien jatorria inflazioa deritzon garaian aurki dezakegu. Inflazioa era ezberdinetan definitu daiteke, baina bere muinean espazioaren hedapen azeleratuko garaia da. Behin hasierako singularitatetik abiatuta, alegia, *Big Bang*-etik, unibertsoa segundo gutxi batzuetan izugarri hedatu zen, gutxi gorabehera 10^{22} faktore bat inguru (Baumann, 2011). Hedapen esponentziala gertatu baino lehen, unibertsoa hutsean zegoen, baina txikitasun horretan fluktuazio kuantikoak zeuden. Horregatik, unibertsoa oso txikia zenean presente zeuden fluktuazio edo ezpurutasun horiek hedapen azeleratuan zehar barreiatu ziren, eta egungo unibertsoaren tamainan zehar hedatu. Horrela, CMBan ikusten ditugun anisotropiak inflazioan zabaldutako fluktuazio kuantikoen aztarna besterik ez dira.

Inflazioa, esan dugun bezala, unibertsoa esponentzialki hazten den garaia da, baina fisikoki nolako eredua da? Kasurik sinpleenean, aipatutako hedapen azeleratua izateko, partikula eskalar bat, ϕ, inflatoi deitu ohi zaiona, eta potentzial, $V(\phi)$, nahikoa lau bat behar dira, honen gainean geldoki higitzeko (ingelesezko *slow-roll* higidura deritzona). Askotariko ereduak daude baldintza horiek betetzen dituztenak: Starobinski inflazio eredua, inflazio eredu hibridoak, amaigabeko inflazioa... Guztiarekin ere, eredu horietan kontu handia izan behar da ultramoreko (ingelesezko siglak UV) efektu fisiko ezezagunekin. Eredu sorta horien artean, eredu arrakastatsuenetako bat axioi inflazioa da. Bertan axioi itxurako partikula batek, $\phi \to \phi + c$ simetrikoa denak, gidatzen du inflazioa. Berau da eredu horretako inflatoia. Axioien simetriaren izaera dela eta, inflatoiaren eta ereduko beste edozein osagairen arteko elkarrekintza oso mugatuta dago, eta inflazioren dinamika UVko efektu fisiko ezezagunetatik babestuta dago.

Axioiak gidatutako inflazio eredu ugari proposatu dira orain arte: inflazio naturala (Freese et al., 1990; Adams et al., 1993), N-flazioa (Dimopoulos et al., 2008; Easther eta McAllister, 2006; Bachlechner et al., 2015) edo axioi monodromia inflazioa (McAllister et al., 2010; Silverstein eta Westphal, 2008). Hala ere, guk aztergai dugun axioi inflazio ereduan, ϕ inflatoiaren eta A_μ *gauge* abeldarraren arteko elkarrekintza ikertu nahi dugu, eta interakzio terminorako aukera bakarra hau da

$$\mathcal{L}_{\text{int}} = -\frac{\sqrt{-g}}{4\Lambda}\phi F_{\mu\nu}\tilde{F}^{\mu\nu} \,. \tag{1}$$

Bertan $F_{\mu\nu} = \partial_\mu A_\nu - \partial_\nu A_\mu$ tentsore elektromagnetikoa da eta $\tilde{F}_{\mu\nu} = \frac{1}{2}\varepsilon_{\mu\nu\sigma\alpha}F^{\sigma\alpha}$ bere duala. Bestalde, $1/\Lambda$ da eremu eskalarraren eta *gauge* eremuaren arteko mihiztadura. Horretaz gain, literaturako aurreko emaitzekin konparaketa egin ahal izateko darabilgun potentziala, $V(\phi) = \frac{1}{2}m^2\phi^2$, koadratikoa da.

Hortaz, materiari dagokion ekintza hau da

$$\mathcal{S}_m = \int \mathrm{d}x^4\sqrt{-g}\left[-\frac{1}{2}\partial_\mu\phi\partial^\mu\phi - \frac{1}{2}m^2\phi^2 - \frac{1}{4}F_{\mu\nu}F^{\mu\nu} - \frac{1}{4\Lambda}\phi F_{\mu\nu}\tilde{F}^{\mu\nu}\right]. \tag{2}$$

Ereduaren higidura-ekuazioak lor daitezke aurreko ekintza bariatuta eta denbora-*gaugea*, $A_0 = 0$, hautatuta (Cuissa eta Figueroa, 2019)

$$\dot{\pi}_\phi = -3H\pi_\phi + \frac{1}{a^2}\vec{\nabla}^2\phi - m^2\phi + \frac{1}{a^3\Lambda}\vec{E}\cdot\vec{B}\,, \tag{3}$$

$$\dot{\vec{E}} = -H\vec{E} - \frac{1}{a^2}\vec{\nabla}\times\vec{B} - \frac{1}{a\Lambda}\pi_\phi\vec{B} + \frac{1}{a\Lambda}\vec{\nabla}\phi\times\vec{E}\,, \tag{4}$$

$$\vec{\nabla}\cdot\vec{E} = -\frac{1}{a\Lambda}\vec{\nabla}\phi\cdot\vec{B}\,, \tag{5}$$

Ekuazioetan a eskala-faktorea da, eta unibertsoaren espantsioa kontrolatzen du. Bertatik, Hubble-ren parametroa, $H = \frac{\dot{a}}{a}$, lor daiteke, ekuazioetan ere presente dagoena. Higidura-ekuazioetan goi-puntuek denborakiko deribatuak adierazten dituzte; denbora kosmikoarekiko, t, hain zuzen ere. Hala ere, ekuazioetan denbora kosmikoa erakusten dugun arren, behagarriak *efold*-ekiko, N_e, irudikatzen dira; izan ere, unibertsoa oso denbora epe laburrean izugarri hedatzen da, eta t denbora eta a eskala faktorea erlazionatzen dituen denbora-parametroa beharrezkoa da

$$N_e = \int \frac{dt}{a(t)} \,. \tag{6}$$

Bestalde, esan den bezala, ereduan bi eremu mota dauzkagu, bata eskalarra eta bestea *gauge* eremua. Horien momentu konjokatuak hauek dira: axioi momentua, abiadura ere deitua, $\pi_\phi \equiv \dot{\phi}$, eta eremu elektrikoa, $E_i \equiv \dot{A}_i$. *Gauge*-arekin lotutako eremu magnetikoa, berriz, ohikoa den gisan definitu dugu, $B_i \equiv \epsilon_{ijk}\partial_j A_k$.

Axioi inflazioa oso interesgarria da, besteak beste, *gauge* eremuaren polarizazioetako baten hazkuntza esponentziala dakarrelako inflazioaren garapenean, eta lehen definitu dugun (1) elkarrekintza terminoa du oinarri (Turner eta Widrow, 1988; Garretson et al., 1992; Anber eta Sorbo, 2006, 2010; Barnaby eta Peloso, 2011; Adshead et al., 2013; Cheng et al., 2016). Kitzikapen horrek bide ematen dio fenomenologia oso aberatsari; garrantzitsuenak dentsitate handiko pertubazioen sorrera (Barnaby eta Peloso, 2011; Barnaby et al., 2012, 2011; Cook eta Sorbo, 2012; Pajer eta Peloso, 2013) eta grabitazio-uhin (kiralen) ekoizpena dira (Adshead et al., 2013; Barnaby et al., 2012; Sorbo, 2011; Cook eta Sorbo, 2013). Gainera, posible da fenomenologia horren aztarnak CMBaren neurketetan, jatorrizko zulo beltzen bilaketan (ingelsezko siglak PBH) (Cheng et al., 2016; Pajer eta Peloso, 2013; Linde et al., 2013; Bugaev eta Klimai, 2014; Garcia-Bellido et al., 2016; Domcke et al., 2017; Cheng et al., 2018) edo

grabitazio-uhin detektagailuetan topatzea (Cook eta Sorbo, 2012; Anber eta Sorbo, 2012; Domcke et al., 2016; Bartolo et al., 2016).

Horren ondorioz, argi dago axioi inflazio ereduaren azterketak unibertsoaren sorrerako lehen aldiuneen informazio oso garrantzitsua eman dakigukeela; izan ere, eredua bera fisikoki esanguratsua izateaz gain, behaketen bidez aurkitu daitezkeen fenomenologia aberatsa du.

2 Arloko egoera eta ikerketaren helburuak

Aurkeztutako higidura-ekuazioen ez-linealtasuna dela-eta ez da posible analitikoki bere osotasunean ebaztea ereduaren dinamika. Orain arte egin diren ikerketa eta emaitza guztietan maila ezberdinetako hurbilketetara jo da.

Lehen aukera eta sinpleena, *erregimen lineala* deritzona kontsideratzea da, eta soilik inflazioaren amaieratik urrun da onargarria hurbilketa. Kasu horretan, inflatoiaren dinamikan eremu elektrikoaren eta magnetikoaren eragina arbuiagarria dela onartzen da, eta, beraz, eremu eskalarrak lehen aipatutako *slow-roll* higidura jarraituko luke. Hurbilketa horretan inflatoiak ez du iturririk inhomogeneotasunak sortzeko. *Gauge* eremuak, berriz, kitzikatu egiten dira axioiaren abiadurarekin, $\dot{\phi}$, duten elkarrekintzagatik. Horrek ezegonkortasun kirala dakar, hots, polarizazioetako bat, A^+ gure kasuan, esponentzialki hazten da, eta, bestea, A^-, aldiz, ez da kitzikatzen.

Hazkuntza hori kontrolatzen duen parametroa hau da

$$\xi = \frac{\dot{\phi}}{2H\Lambda}\,. \tag{7}$$

Dena den, argi dago hurbilketa ez dela onargarria inflazioaren iraupen osoan zehar; izan ere, *gauge* eremuak hazi ahala, euren efektua geroz eta garrantzitsuagoa da eremu eskalarraren dinamikan. Gainera, mihiztadura-parametroa, $1/\Lambda$, zenbat eta handiagoa izan, orduan eta bortitzagoa da efektua, (3) ekuazioko azken terminoa horren adierazgarri.

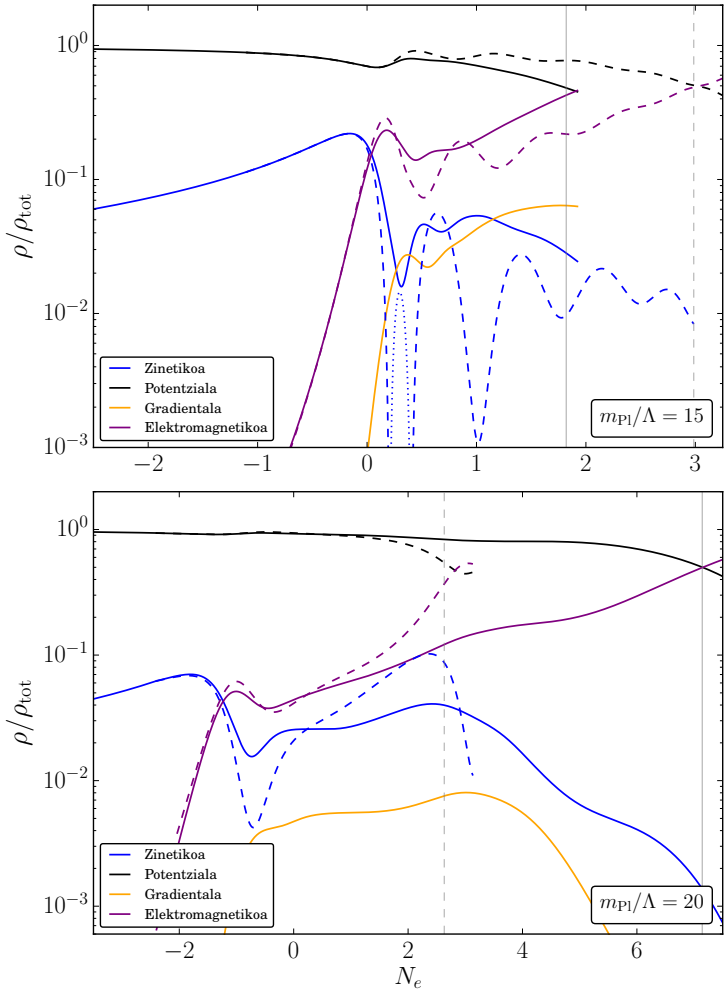
Hurrengo hurbilketa mailan *gauge* eremuek inflatoiaren dinamikan duten eragina sartzen da, baina eremu eskalarra homogeno mantenduta. Beraz, hurbilketan inhomogeitateak ez dira kontuan hartzen. Orain arte, literaturan bi era ezberdinetara ebatzi da inhomogeneotasunik gabe axioi inflazioa. Lehengoan ekuazio integro-diferentzial dinamikoen sistema bat modu autokontsistentean (iteratiboki) ebazten dute (Cheng et al., 2016; Notari eta Tywoniuk, 2016; Dall'Agata et al., 2020; Domcke et al., 2020). Bigarrenean, *gradient expansion* deritzon metodoa erabiltzen dute, zeinak ekuazioetan eremu elektriko eta magnetikoen ekarpena ereduztatzen duen, horretarako eraikuntza bilinealetan oinarritzen diren esperotako balioak erabilita (Sobol et al., 2019; Gorbar et al., 2021). Era batean zein bestean antzeko ondorietara iristen dira: eremu eskalarraren abiaduraren portaera oszilakorraren ondorioz, *gauge* eremuaren ekoizpena handitzen da erresonanteki; eta izaera horrek berak *gauge*-aren zein perturbazio eskalar eta tentsiorialen espektroan ezaugarri oszilakorrak sortzen ditu.

Lehen aipatutako axioi inflazioko fenomenologia aberatsa azken hurbilketa mailarako lortu da, hau da, aurresandako behagarrien mugak eta balioak kasu homogeneorako lortu dira soilik. Ondorioz, eredua ez da bere osotasunean aztertu. Horregatik, guk gauzatutako lanaren helburua lehen aldiz eredua inongo hurbilketarik gabe aztertzea da, eta lortutako emaitzak lehengoekin konparatzea. Horretarako, eta esan bezala analitikoki ebazpena ezinezko den heinean, *lattice* eremu teoria erabiltzea da gure estrategia, hau da, hiru dimentsiotan espazialki diskretizatutako kutxa batean, higidura-ekuazioak osorik eboluzionatzea. Hori dena konputazionalki. Beraz, zehazki lan honen helburua axioi inflazio aztertzeko oinarriak finkatzea da, formalismo egoki bat izatea; horrela, behin edukita, fenomenologiako muga eta balioak birkalkulatzea ahalbidetuko du. Gainera, konparaziorako kasu homogeneo propioak izateko, diseinatutako formalismoa egokitu dugu eta gisa horretako simulazioak ere egin ditugu.

3 Ikerketaren muina

Artikulu honetan axioi inflazio ereduaren dinamika ez-lineala aztertu dugu bere osotasunean. Horretarako (3), (4) eta (5) higidura-ekuazioak ebatzi ditugu, unibertsoaren hedapena zehazten duten Friedmann-en ekuazioekin batera. Herraminta nagusia *lattice* diskretizatuak dira, eta horretarako CosmoLattice liburutegiaz baliatu gara (Figueroa et al., 2023). Gainera, diskretizazio espaziala era kontsistentean egiteko (Figueroa eta Shaposhnikov, 2018; Cuissa eta Figueroa, 2019) erreferentzietan aurkeztutako gidalerroetan oinarritu gara. Horretaz gain, denbora diskretizatzeko bigarren ordenako Runge-Kutta eskema baliatu dugu. Horiek horrela, $\mathcal{O}(dx^2, dt^2)$ ordenako sistema

1. Irudia: Energia-dentsitateak $m_{\rm pl}/\Lambda = 15$ eta $m_{\rm pl}/\Lambda = 20$ kasuetarako.



diskretu baten bidez eboluzionatzen dugu axioi inflazio ereduko dinamika, hots, bai espazioan eta bai denboran gure 3 dimentsioko kutxan (3), (4) eta (5) ekuazio jarraituak bigarren ordenara arte betetzen ditugu.

Artikulu honetan bi mihiztadura-parametroren emaitzak erakusten ditugu, $m_{\rm pl}/\Lambda = 15$ eta 20, non $m_{\rm pl} = \sqrt{c\hbar/8\pi G}$ Planck-en masa murriztua den; eta c argiaren abiadura, G grabitazio unibertsalaren konstantea eta $\hbar$ Planck-en konstante murriztua. Bi balio horietara jo dugu literaturan kasu homogeneorako jada aztertu direlako eta fenomenologian ezarritako mugetatik gertu daudelako. Gainera, aurkeztuko ditugun emaitza guztietan guk eboluzionatutako kasu homogeneoarekin ikusten ditugun aldeak azpimarratuko ditugu. Hala nola, lehen azpimarratu dugun moduan denbora unitate gisa *efold*-ak, N_e, erabili ditugu.

Aztertu dugun lehen behagarria ρ energia dentsitatea da. 1. irudian $m_{\rm pl}/\Lambda = 15$ (goian) eta 20 (behean) kasuen energia-dentsitateak aztertu ditugu. Zehazki energia dentsitatearen gai ezberdinen eboluzioa, energia totalarekiko, $\rho_{\rm tot}$, normalizatuta: energia eskalar potentziala beltzez, eskalar zinetikoa urdinez, eskalar gradientea laranjaz eta elektromagnetikoa morez. Lerro jarraituak dinamika ez-lineal osoarentzako eta etenak kasu homogeneorako. Inflazioaren amaiera lerro bertikal baten bidez adierazi dugu, aipatu dugun lerro mota bereizketa berarekin, jarraitua ez-lineal osoa eta etena homogenoa. Azkenik, abiadura negatiboa denean puntu bidezko lerroak erabili ditugu.

Hurbilketa homogeneoan zein ez-lineal osoan *gauge*-en ekarpena, alegia, energia elektromagnetikoarena, igotzen doa inflatoiaren abiaduran eragin arte. Efektu hori energia zinetikoaren portaeran isladatzen da. Horrek, era berean, *gauge*-en hazkuntza moteltzen du. Bestalde, simulazio ez-lineal osoan gradienteen energia nabarmenki hazten da, energia zinetikoarekin konpargarria izan arte edo kasu batzuetan gailentzera iritsi arte. $m_{\rm pl}/\Lambda = 15$

mihiztadura-parametrorako lehenago gertatzen da, $m_{\rm pl}/\Lambda = 20$-rako baino, baina bietan efektu berbera ikusten dugu. Horretaz gain, kontuan izan definizioz kasu homogenoan ez daukagula gradienteen ekarpenik.

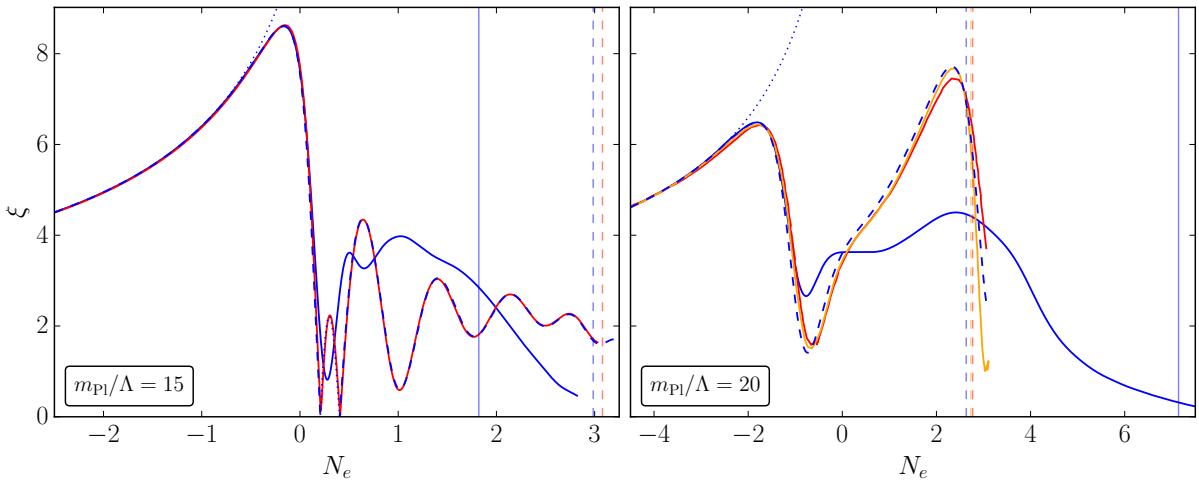
Inflazioaren amaierari dagokionez, bai hurbilketa homogeneoan, bai ez-lineal osoan erregimen linealean aurresaten denarekiko nabarmen atzeratzen da (gogoratu kasu linealean inflazioa $N_e = 0$-n amaitzen dela). Hala ere, inflazio amaiera uneak ez datoz bat homogeneoan eta ez-lineal osoan. $m_{\rm pl}/\Lambda = 15$-rako inflazioak homogeneoan gehiago irauten duen arren, $m_{\rm pl}/\Lambda = 20$ kasuan aurkakoa gertatzen da.

Inflazioa amaitzeko mekanismoa homogeneoan zein ez-lineal osoan berbera da. Aipatu dugun gisa ekarpen zinetikoak energia elektromagnetikoaren hazkuntza atzeratzen du, baina ez du eteten. *Gauge*-en kontribuzioak igotzen jarraitzen du, eta kontribuzioa energia eskalar potentzialaren hainakoa denean inflazioa bukatu egiten da.

Sistema ez-lineal osoan *gauge* eremuek dinamika eskalarraren gainean duten eragina aztertzeko ξ behagarria baliatu dugu, (7) ekuazioan definitu duguna. Emaitzak 2. irudian barnebildu ditugu. Oraingo honetan $m_{\rm pl}/\Lambda = 15$ (ezkerrean) eta 20 (eskuinean) kasuetako portaera erakutsi dugu. Lerro urdin jarraiek sistema ez-lineal osoaren eboluzioa erakusten dute, eten urdinek guk gauzatutako kasu homogeneoarena. Azkenik, literaturatik lehen esandako kasu homogenoak ere sartu ditugu, lerro gorriz Domcke et al. (2020) eta laranjaz Gorbar et al. (2021). Horrela, gure kasu homogenoak ondo gauzatuta daudela konproba dezakegu. Bestalde, kasu bakoitzerako kolore kode berarekin, lerro bertikalek inflazioaren amaiera adierazten dute. Erreferentzia gisa erregimen linealaren eboluzioa ere gehitu dugu, puntu bidezko lerroen bidez.

Erregimen linealaren kasuan ξ monotonoki hazten da, puntu bidezko lerroek adierazten duten gisa. Ez-lineal osoan zein homogeneoan *gauge* eremuek eremu eskalarraren dinamikan eragiten dute eta jarrera monotono hori aldatzen dute, bai $m_{\rm pl}/\Lambda = 15$, bai $m_{\rm pl}/\Lambda = 20$ kasuetan. Bestalde, guk *lattice*-an egindako kasu homogeneoan lortzen duguna hein handi batean bat dator literaturan aurki daitezkeen aurreko emaitzekin.

2. Irudia: ξ-ren eboluzioa $m_{\rm pl}/\Lambda = 15$ eta $m_{\rm pl}/\Lambda = 20$ kasuetarako



Literaturako aurreko emaitzek ξ-n jarrera oszilakorra aurresaten zuten, bereziki $m_{\rm pl}/\Lambda = 15$ kasurako. Hori inflatoiaren $\dot{\phi}$ abiaduraren jarrera oszilakorrak sortua da. Izatez, $m_{\rm pl}/\Lambda = 15$ kasuan, 0 eta 1 *efold*-en inguruan abiadurak zeinuz aldatzen du (puntuak erabili ditugu lerro etenen ordez).

Sistema ez-lineal osoan ez dugu jarrera oszilakor hori ikusten, ξ ez da monotonoa, baina ez dauka aipatutako jarrera. $m_{\rm pl}/\Lambda = 15$ kasuan oso argi ikusten dira aldeak, eta, gainera, ez-lineal osoan ez dago homogeneorako aipatu dugun zeinu aldaketa abiaduran.

$m_{\rm pl}/\Lambda = 20$ mihiztadura-parametroaren kasuan ere jarrera oszilakorra behatzen dugu kasu homogeneoan. Dena den, ez da $m_{\rm pl}/\Lambda = 15$ kasuko homogeneoa bezain nabaria, leunagoa da efektua. Horretaz gain, berriro ere, sistema ez-lineal osoan ξ-ren jarrera homogeneoan baino lauagoa da, eta inflazioaren amaiera asko luzatzen da, homogeneoa baino 4 *efold* gehiago.

4 Ondorioak

Lan honetan lehenengo aldiz axioi inflazio ereduaren azterketa egin dugu sistema ez-lineal osorako, inhomogeneotasunak arbuiatu gabe eta simulazioak inflazioaren amaierara arte luzatuta. Emaitzetan mihiztadura-parametro ezberdinetarako energiaren eta ξ parametroaren eboluzioa erakutsi dugu, bai guk gauzatutako kasu homogeneorako, bai ez-lineal osorako; eta euren arteko aldeak nabariak dira:

- Kasu homogeneoan aurresaten zenarekin bat, inflazioaren amaiera erregimen linealak aurresandakoaren ondoren gertatzen da sistema ez-lineal osoa eboluzionatzen dugunean, baina amaiera horiek ez datoz bat euren artean. Gainera, mihiztadura-parametroaren arabera inflazioaren iraupena homogeneoan baino luzeagoa edo motzagoa izan daiteke sistema ez-lineal osoan.
- Gradienteen energiaren eragina nabaria da, beste ekarpen batzuen mailara iritsi arte. Beraz, inhomogeneotasun eskalarrak ez dira arbuiagarriak.
- ξ behagarriaren forma guztiz ezberdina da ez-lineal osoan homogeneoarekin alderatuta. Era orokorrean, hurbilketa homogeneoan aurresandako oszilazio bortitzik ez dela nabari behatu dugu, ezta kasu batzuetan ager daitezkeen abiaduraren zeinu aldaketak ere.

Oro har, lan honetatik atera dezakegun ondorio nagusia da beharrezkoa dela axioi inflazio eredua bere osotasunean kontsideratzea. Hurbilketa homogeneoak ez dira nahikoa dinamikaren azterketa egokia egiteko, eta plazaratu ditugun emaitzek erakusten duten gisan inhomogeneotasunek garrantzi handia dute sisteman.

Azkenik, aipatu nahi genuke artikulu honen xedea ez dela izan gauzatu ditugun simulazioen teknikotasunetan sartzea, lortutako emaitza fisikoak azpimarratzea baizik. Hala ere, orain arte ez da aukerarik izan axioi inflazio ereduaren dinamika bere osotasunean simulatzeko. Artikulu honetara eraman duen lanaren muina oinarri tekniko hori guztia garatzea izan da: diskretizazio eskema kontsistentea proposatzea, denbora integratzaile egokia aukeratzea, Cosmolattice bezalako ingurune konputazional eraginkor batean inplementatzea, hasierako baldintza egokiak topatzea eta gauzatzea, eta abar. Ondorioz, nahiz eta hemen alderdi hauetan ez dugun sakondu, nabarmentzekoa iruditzen zaigu beharrezko tresneria guztia garatzeko egindako lana aldarrikatzea, eta, gainera, erakustea guzitz beharrezkoa dela eredua era egoki batean aztertzeko.

5 Etorkizunerako planteatzen den norabidea

Artikuluan argi gelditu den moduan, axioi inflazio eredua era egokian aztertzeko beharrezkoa da sistema ez-lineal osoa kontsideratzea. Ez dira makalak orain arte literaturan aurki genitzakeen eta guk lortutako emaitzen arteko aldeak. Horrek orain arte lortu diren iragarpen fenomenologikoei berrikuspen sistematikoa egiteko beharra azaleratzen du. Hori egiteko, gainera, jadanik garatua dugu dinamika ez-lineala era egokian eboluzionatzen duen kodea.

Hori kontuan izanik, hainbat kolaborazio ditugu martxan eredu honek daukan fenomenologia aberatsari lotutako iragarpenak berrikusten hasteko. Horien artean, azpimarragarrienak, inflazioan zein hau amaitu eta laster sortutakoa grabitazio-uhinen hondo kosmikoaren kalkulua edo jatorrizko zulo beltzei bide ematen dieten perturbazio eskalarren lorpena genituzke. Biek hala biek emandako iragarpenak behaketa esperimental modernoenen datuekin epe labur-ertainean kontrastean jarriko ditugu, axio inflazioaren baliagarritasuna ahalik eta zehatzen ebaluatzeko.

Horretaz gain, epe ertain-luzean, eredua orokortzea helburu duten gehipenak ere sartzea da gure beste ideietako bat; hala nola, axioiak *gauge* simetria handiagotik eratorritako *gauge* eremuekin izan ditzakeen mihiztadurak gehituz edo fermioiekin elkarrekintza jasoko luketen korronteak sartuz adibidez.

Argi dago beraz lan honetan aurrerapauso izugarria eman dugula axioi inflazio ereduaren fisika aztertzeko. Hala ere, ikerkuntzaren hasierako fasean gaude soilik, esan dugun gisa espektro zabala dugu aztertzeko oraindik, bai martxan dauzkagun kolaborazioetan baita etorriko diren berrietan ere. Funtsean oinarria finkatu dugu eta egoera ezin hobean gaude etorkizunean aurrerapausoak emateko.

Erreferentziak

Adams, F. C., Bond, J. R., Freese, K., Frieman, J. A., & Olinto, A. V. (1993). Natural inflation: Particle physics models, power law spectra for large scale structure, and constraints from COBE. *Phys. Rev. D*, 47:426–455.

Adshead, P., Martinec, E., & Wyman, M. (2013). Gauge fields and inflation: Chiral gravitational waves, fluctuations, and the Lyth bound. *Phys. Rev. D*, 88(2):021302.

Anber, M. M. & Sorbo, L. (2006). N-flationary magnetic fields. *JCAP*, 10:018.

Anber, M. M. & Sorbo, L. (2010). Naturally inflating on steep potentials through electromagnetic dissipation. *Phys. Rev. D*, 81:043534.

Anber, M. M. & Sorbo, L. (2012). Non-Gaussianities and chiral gravitational waves in natural steep inflation. *Phys. Rev. D*, 85:123537.

Bachlechner, T. C., Dias, M., Frazer, J., & McAllister, L. (2015). Chaotic inflation with kinetic alignment of axion fields. *Phys. Rev. D*, 91(2):023520.

Barnaby, N., Namba, R., & Peloso, M. (2011). Phenomenology of a Pseudo-Scalar Inflaton: Naturally Large Nongaussianity. *JCAP*, 04:009.

Barnaby, N., Pajer, E., & Peloso, M. (2012). Gauge Field Production in Axion Inflation: Consequences for Monodromy, non-Gaussianity in the CMB, and Gravitational Waves at Interferometers. *Phys. Rev. D*, 85:023525.

Barnaby, N. & Peloso, M. (2011). Large Nongaussianity in Axion Inflation. *Phys. Rev. Lett.*, 106:181301.

Bartolo, N. et al. (2016). Science with the space-based interferometer LISA. IV: Probing inflation with gravitational waves. *JCAP*, 12:026.

Baumann, D. (2011). Inflation. In *Theoretical Advanced Study Institute in Elementary Particle Physics: Physics of the Large and the Small*, 523–686.

Bugaev, E. & Klimai, P. (2014). Axion inflation with gauge field production and primordial black holes. *Phys. Rev. D*, 90(10):103501.

Cheng, S.-L., Lee, W., & Ng, K.-W. (2016). Numerical study of pseudoscalar inflation with an axion-gauge field coupling. *Phys. Rev. D*, 93(6):063510.

Cheng, S.-L., Lee, W., & Ng, K.-W. (2018). Primordial black holes and associated gravitational waves in axion monodromy inflation. *JCAP*, 07:001.

Cook, J. L. & Sorbo, L. (2012). Particle production during inflation and gravitational waves detectable by ground-based interferometers. *Phys. Rev. D*, 85:023534. [Erratum: Phys.Rev.D 86, 069901 (2012)].

Cook, J. L. & Sorbo, L. (2013). An inflationary model with small scalar and large tensor nongaussianities. *JCAP*, 11:047.

Cuissa, J. R. C. & Figueroa, D. G. (2019). Lattice formulation of axion inflation. Application to preheating. *JCAP*, 06:002.

Dall'Agata, G., González-Martín, S., Papageorgiou, A., & Peloso, M. (2020). Warm dark energy. *JCAP*, 08:032.

Dimopoulos, S., Kachru, S., McGreevy, J., & Wacker, J. G. (2008). N-flation. *JCAP*, 08:003.

Domcke, V., Ema, Y., & Mukaida, K. (2020). Chiral Anomaly, Schwinger Effect, Euler-Heisenberg Lagrangian, and application to axion inflation. *JHEP*, 02:055.

Domcke, V., Muia, F., Pieroni, M., & Witkowski, L. T. (2017). PBH dark matter from axion inflation. *JCAP*, 07:048.

Domcke, V., Pieroni, M., & Binétruy, P. (2016). Primordial gravitational waves for universality classes of pseudoscalar inflation. *JCAP*, 06:031.

Easther, R. & McAllister, L. (2006). Random matrices and the spectrum of N-flation. *JCAP*, 05:018.

Figueroa, D. G., Florio, A., Torrenti, F., & Valkenburg, W. (2023). CosmoLattice: A modern code for lattice simulations of scalar and gauge field dynamics in an expanding universe. *Comput. Phys. Commun.*, 283:108586.

Figueroa, D. G. & Shaposhnikov, M. (2018). Lattice implementation of Abelian gauge theories with Chern–Simons number and an axion field. *Nucl. Phys. B*, 926:544–569.

Freese, K., Frieman, J. A., & Olinto, A. V. (1990). Natural inflation with pseudo - Nambu-Goldstone bosons. *Phys. Rev. Lett.*, 65:3233–3236.

Garcia-Bellido, J., Peloso, M., & Unal, C. (2016). Gravitational waves at interferometer scales and primordial black holes in axion inflation. *JCAP*, 12:031.

Garretson, W. D., Field, G. B., & Carroll, S. M. (1992). Primordial magnetic fields from pseudoGoldstone bosons. *Phys. Rev. D*, 46:5346–5351.

Gorbar, E. V., Schmitz, K., Sobol, O. O., & Vilchinskii, S. I. (2021). Gauge-field production during axion inflation in the gradient expansion formalism. *Phys. Rev. D*, 104(12):123504.

Linde, A., Mooij, S., & Pajer, E. (2013). Gauge field production in supergravity inflation: Local non-Gaussianity and primordial black holes. *Phys. Rev. D*, 87(10):103506.

McAllister, L., Silverstein, E., & Westphal, A. (2010). Gravity Waves and Linear Inflation from Axion Monodromy. *Phys. Rev. D*, 82:046003.

Notari, A. & Tywoniuk, K. (2016). Dissipative Axial Inflation. *JCAP*, 12:038.

Pajer, E. & Peloso, M. (2013). A review of Axion Inflation in the era of Planck. *Class. Quant. Grav.*, 30:214002.

Silverstein, E. & Westphal, A. (2008). Monodromy in the CMB: Gravity Waves and String Inflation. *Phys. Rev. D*, 78:106003.

Sobol, O. O., Gorbar, E. V., & Vilchinskii, S. I. (2019). Backreaction of electromagnetic fields and the Schwinger effect in pseudoscalar inflation magnetogenesis. *Phys. Rev. D*, 100(6):063523.

Sorbo, L. (2011). Parity violation in the Cosmic Microwave Background from a pseudoscalar inflaton. *JCAP*, 06:003.

Turner, M. S. & Widrow, L. M. (1988). Gravitational Production of Scalar Particles in Inflationary Universe Models. *Phys. Rev. D*, 37:3428.

6 Eskerrak eta oharrak

Lan honetako kodea Cosmolattice simulazio paketean garatu da, eta simulazio guztiak ARINA klusterrean gauzatu dira. Ander Urio egileak eskerrak eman nahi dizkio Juan Luis Bidarteri testuan egindako zuzenketengatik, eta erreferentzia egiten dio Euskal Herriko Unibertsitateko PIF20/151 diru-laguntzari.

Mikroplastikoen analisia sedimentuetan: Prozedura baten proposamena, balidazioa eta aplikazioa

Uxue Uribe Martínez[1], Thomas Maupas[1], Olivia Gómez Laserna[1], Leire Kortazar[1], Luis Ángel Fernandez Cuadrado[1,2], Leire Mijangos[1,2], Alberto de Diego[1,2]
(1) Kimika Analitikoa Saila, Zientzia eta Teknologia Fakultatea, Euskal Herriko Unibertsitatea (UPV/EHU), P.K. 48940, Leioa, Bizkaia, (2) Plentziako Itsas Estazioa (PIE), Euskal Herriko Unibertsitatea (UPV/EHU), P.K. 48620, Plentzia, Bizkaia
uxue.uribe@ehu.eus

Laburpena

Mikroplastikoak (MP) nonahikoak dira itsas ingurunean. Haien banaketa zabalaren ondorioz, eta kutsatzaileak adsorbatzeko duten gaitasunagatik, MPen toxizitatea uretako organismoentzat handia da. Azken urtetan, sedimentuetako MPen kutsadurari buruzko ikerketa asko egin izan dira. Hala ere, ez dago metodo estandarizaturik laginketa egiteko, laginak prestatzeko eta analisiak burutzeko. Bibliografian aurkitutako hainbat metodo aztertu ondoren, sedimentuetan dauden MPak detektatzeko eta karakterizatzeko metodo bat proposatzen eta balioztatzen dugu lan honetan, benetako laginetan frogatuta emaitza onak eman dituena.

Hitz gakoak: Mikroplastikoak, sedimentuak, laginaren tratamendua, kostaldeko inguruneak Raman espektroskopia

Abstract

Microplastics (MP) are ubiquitous in the marine environment, their wide distribution makes them available to aquatic organisms, accentuating the toxic risk due to their capacity to adsorb pollutants. Numerous studies on MP contamination in sediments have been carried out in recent years. However, there are no standardized methods for sampling, sample preparation and analysis. In this work, after reviewing different options available in the literature, we propose an analytical method to detect and characterize MPs in sediment samples. Checks its reliability an applied to the analysis of real samples with satisfactory results.

Keywords: Microplastics, sediments, sample treatment, coastal environments, Raman spectroscopy

1. Sarrera eta motibazioa (Formatu orokorra eta bibliografia)

Plastikoen ekoizpen masiboak, 1950eko hamarkadan hasi zenak, biosferan nagusi diren hondakin antropogeniko bihurtu ditu plastikoak, eta gure planetak aurre egin beharreko kutsadura-arazo handienetako bat izatera iritsi da. Sarrera gehienak erabilera bakarreko plastikoetatik, zabor publikotik, hondakin uren isurketetatik, bilgarrietarako materialetatik, itsasontziek sortutako zaborretatik eta arrantza lanabesetatik datoz. Haizeak, korronteek eta olatuek garraiatzen dituzte, eta ingurumen-konpartimentu desberdinetara iristen dira, hala nola munduko ur-sistemetara; azaleko uretara, ur-zutabera eta sedimentuetara (Barnes et al., 2009; Guo eta Wang, 2019).

Hainbat meteorizazio kimiko eta mekanikoren ondorioz, plastikoak zati txikiagotan txikitzen dira ingurumenean. Mikroplastiko (MP) terminoa uretako partikula solido, sintetiko eta disolbaezin gisa definitzen da, eta nahiz eta oraindik ez dagoen adostasun orokorrik bere tamainari dagokionez, oro har AEBko Ozeanografia eta Atmosferaren Agentzia Nazionalaren (NOAA, ingelesez) eta Europako Itsas Estrategiari buruzko esparru-zuzentaraua (MSFD, ingelesez) definizioaren arabera, gutxienez dimentsio batean 5 mm-tik beherako forma duten plastikozko partikulak MP gisa sailkatzen dira. Beste MP-iturri batzuk kosmetikoetatik (hala nola aurpegiko garbitzailetatik, eta esfoliatzailetatik) datozen partikula mikroskopikoak kanporatzen dituzten hondakin-uren sistemak eta ibai-isurketak dira (Brennecke et al., 2015).

Tamaina txikia dutenez, erraz sakabanatzen dira ingurumenean eta izaki bizidunek irensteko arriskua ere handia da. Izaki bizidunen gorputzean metatu eta kate trofikoetan banatu daitezke. Gainera, azalera/bolumen erlazio handia dutenez, MPek adsorbatu eta metatu egiten dituzte beren

gainazalean uraren zutabean dauden poluitzaileak, esaterako, kutsatzaile kimiko organikoak (Wang et al., 2018). Beraz, MPek kalte mekanikoak eragiteaz gain, beste kutsatzaile batzuk ere itsas sare trofikoan sartzea errazten dute (Bakir et al., 2012), itsasoko bizitza eta ingurune ekologikoa arriskuan jarriz.

Poluitzaileek MPetan duten garraio-ahalmena eta kate trofikoan sartzearekin lotutako arriskua ezagutzeko, lehenik eta behin, MPak identifikatu eta haien ezaugarri morfologiko eta kimikoak zehaztu behar dira ingurumen-konpartimentu ezberdinetan, hala nola ur gezatan, hondakin-uretan, itsasoko uretan, sedimentuetan eta biotan (Stock et al., 2019).

MPen epe luzeko hustubideak dira sedimentuak. Itsasoko urak baino dentsitate altuagoa duten plastikoak (1,02 g cm^{-3}) sedimentuan hondoratu eta metatzen dira; dentsitate baxuko partikulak, berriz, itsasoaren azalean edo ur-zutabean flotatzeko joera dute. Hala ere, MPen dentsitatea alda daiteke ingurune naturaletan faktore desberdinen ondorioz, dentsitate baxuko plastikoak ere itsas hondora irits daitezke (Van Cauwenberghe et al., 2015).

Sedimentuetan MPak identifikatzeko eta kuantifikatzeko literaturan deskribatutako metodoak eta teknikak gero eta ugariagoak dira (Van Cauwenberghe et al., 2015; Stock et al., 2019). Lagin bakoitzak problematika espezifikoa duenez, oraindik ez da proposatu ofizialtzat hartu daitekeen metodo orokorrik. Azpimarratu behar da oso zaila dela metodologia desberdinek dituzten ikerketak elkarren artean konparatzea. Beraz, garrantzitsua da laginketa-protokolo bat bateratzea, baita konpartimentu guztietan MPak identifikatzeko eta karakterizatzeko metodologiak adostea ere.

2. Arloko egoera eta ikerketaren helburuak

Laginketa, bereizketa, garbiketa eta analisia dira sedimentuetako MPak detektatu eta karakterizatzeko metodologiaren urratsik nagusienak.

Laginketa ahalik eta adierazgarrien diseinatzeak berebiziko garrantzia du, eragin nabarmena baitu analisiaren emaitzetan. Kontuan hartu behar dira bai plastikoen propietateak eta ezaugarriak (tamaina, forma, dentsitatea, etab.), bai ingurunearen ezaugarriak (matrizea, azalera, sakonera, etab.) (Hanvey et al., 2017). Gehienetan, sedimentua eskuz biltzen da, lagindu nahi den azalera eta sakonera definitu ondoren. Hainbat modutan egin daiteke: i) begi hutsez, hauteman daitezkeen MPak besterik ez hartuz (Stock et al., 2019), ii) lagin-bolumen guztia hartuz (Campanale et al., 2020) edo, iii) definitutako azaleran eta sakoneran dagoen bolumen osoa lekuan bertan bahetuz (Van Cauwenberghe et al., 2015; Stock et al., 2019). Egileen artean ez dago adostasunik lagindu behar den kantitateari dagokionez: laginen pisua 0,5 kg-tik 10 kg-ra doa, eta sakonera, berriz, 5 cm-tik 30 cm-ra (Campanale et al., 2020).

Laginak laborategira eramaten dira gero tratamendua bertan aurrera eramateko. MPak matrizetik bereizi behar dira lehen. Metodorik erabiliena dentsitatean oinarritutako flotazioarena da (Rocha-Santos eta Duarte, 2015). MPen dentsitatea aldatzen da konposizio kimikoaren arabera (0,01tik 2,30 g·cm^{3-}-ra). Sedimentuetako beste osagai batzuek (silikatoek, besteak beste) dentsitate altuagoa dute (3,2 g cm^{-3}). Beste batzuk (materia organikoak, adibidez), aldiz, antzeko dentsitatea dute (Campanale et al., 2020). MP-ak bereizteko, dentsitatean oinarritutako flotazioaren bidezko banaketa erabiltzen da. Metodologia honetan gatz disoluzio asetua erabiltzeak dentsitate baxuagoko MPen flotazioa eragiten du Sodio kloruroa (NaCl) izan da MPak bereizteko gehien erabili izan den gatza. Prozesuan, alabaina, dentsitate baxuko material gehiago (materia organikoa, kasu) bereizten da sedimentutik MPekin batera (Rocha-Santos eta Duarte, 2015). Materia organikoaren digestioa erreaktibo azidoen, basikoen, oxidatzaileen edo entzimatikoen bidez egin daiteke (Hidalgo-Ruz et al., 2012), metodologia hauen abantailak eta desabantailak 3.1.2. eta 3.1.3. ataletan aipatuko dira. Hidrogeno peroxidoa (H_2O_2) eta Fenton delako erreaktiboa dira digestioan gehien erabiltzen direnak (Alprol et al., 2021).

MP-en bereizketa eta garbiketaren ondoren geratzen den material solidoa iragazi behar da. Urrats honetan bereizitako MPak zein tamainatan banandu nahi diren zehaztu behar da. Horren

araberako sare-begidun iragazki aproposak erabiliz iragazi behar da lagina, hutsaren bidez lagundua (Hidalgo-Ruz et al., 2012).

Intereseko MPak iragazki batean isolatuta daudenean, haien kuantifikazioa eta karakterizazio fisikoa zein kimikoa egin behar da, hots, plastikoaren izaera kimikoa, tamaina, kolorea eta forma definitu behar dira (Rocha-Santos eta Duarte, 2015). Karakterizazio kimikoa egiteko infragorrizko espektroskopia (IR) eta Raman espektroskopia dira gaur egun gehien erabiltzen diren teknikak, baina badira beste teknika batzuk ere, hala nola, mikroskopia elektronikoa, pirolisi ondorengo gas kromatografia/masa-espektrometria (pyr-GC-MS) eta X izpien fluoreszentziazko espektroskopia (XRF) (Sobhani et al., 2019).

Aurrean aipatutako guztia kontutan hartuz, ikerlana honen helburu nagusia definitu zen, hots, sedimentuetako MPen bereizketa eta karakterizazioa egiteko metologia berri bat proposatzea eta balioztatzea. Urrats guztiak balioztatu ondoren, Urdaibaiko UNESCOko Biosferako Erreserban lortutako sedimentu-lagin erreal baten analisian aplikatzea. Lan hau PLASTeMER (Erref.: PID2020-118685RB-I00) akronimoa duen ikerketa-proiektuaren testuinguru zabalagoan dago kokatuta. Proiektuan MPek kutsatzaile organiko zein ez-organikoak garraiatzeko duten gaitasuna aztertu nahi da, baita honek MPen toxikotasunean duen eragina ikertu ere.

3. Ikerketaren muina

3.1. Metodologia baten proposamena

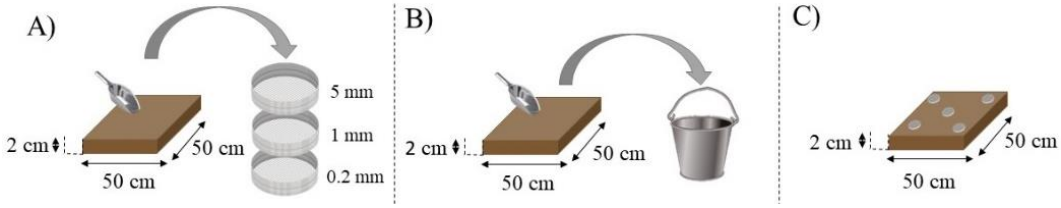
3.1.1. Laginketa

MPen presentzia sedimentuetan aztertzeko ezer baino lehen ahalik eta lagin adierazgarriren bat hartu behar da.

Bibliografia aztertu eta gero, hiru prozedura saiatu ziren: i) 50 × 50 cm-ko laukia markatu, gainazaleko lehen 2 cm-ko sedimentua bahetu lekuan bertan 200, 1000 eta 5000 μm-ko baheak erabiliz eta bahe bakoitzean geratutako material solidoa bildu eta laborategira eraman (1A. Irudia); ii) 50 × 50 cm-ko laukia markatu, gainazaleko lehen 2 cm-ko geruza guztia batu kubo metaliko batean eta laborategira eraman (1B. Irudia); iii).- 50 × 50 cm-ko laukia markatu, bertan 5 azpilagin hartu 5 lata metalikotan (ϕ8cm, 2 cm-ko altuera) eta laborategira eraman (1C. Irudia).

Prozedura bakoitzaren alde onak eta txarrak ondorengoak dira. Lehenaren kasuan, laborategira eraman behar den laginaren tamaina txikia da, laborategiko prozesatzea azkartuz. Baina lekuan bertan egindako baheketan frakzio fina nekez bahetu daiteke, oso kantitate handia egoten delako. Gainera, baheetan geratzen den material solidoa berreskuratzea zaila da. Bigarren prozeduraren kasuan, laginketa azkarra da, baina laborategira eraman behar den laginaren bolumena handiegia da laborategian tratatu ahal izateko. Hirugarren kasuan, berriz, laginketa-denbora azkarra izateaz gain, laborategira eraman behar den laginaren bolumena txikia da; lagin bakar batekin ezin denez lagin adierazgarririk lortu, bost azpilagin hartzea erabaki zen.

Prozedura bakoitzaren abantaila eta desabantailak aztertuta, hirugarrena aproposena dela erabaki zen; izan ere, 5 lata lagin hartu behar diren arren, laborategian tratatu behar den laginaren bolumena txikiagoa da oraindik, laginketa azkar burutzen da, eta MPak galtzeko aukera txikia da. Laginak laborategian 4 °C-tan gordetzea komenigarria da prozesatu arte.



1. Irudia. Laginketa egiteko erabilitako metodologiak.

3.1.2. MP-en bereizketa matrizetik

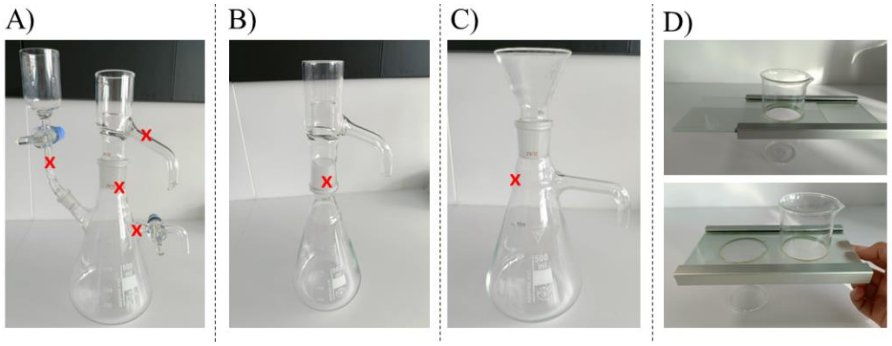
MPak sedimentutik bereizteko dentsitatearen araberako flotazio-metodoa da erabiliena. Dentsitatea altuko disoluzioa lortzeko hiru erreaktibo saiatu genituen, sodio kloruroa (NaCl, 1,12 g cm^{-3}), Zink kloruroa ($ZnCl_2$, 2,91 g cm^{-3}) eta sodio ioduroa (NaI, 3,67 g cm^{-3}).

NaCl-zko disoluzioak plastiko batzuek baino dentsitate txikiagoa du (0,8-1,4 g cm^{-3}) eta, ondorioz, disoluzio merkea eta ez-toxikoa izan arren, aukera hori baztertzea erabaki zen. $ZnCl_2$-aren disoluzioaren dentsitatea altu samarra da, baina bere manipulazioa zaila dela eta, banantzean eta iragaztean, baztertzea erabaki zen; gainera, oso toxikoa da. NaI-zko disoluzioek, nahiz eta toxiko eta garesti samarra izan, MP gehienak flotarazteko dentsitate altua dute.

Hiru disoluzioekin probak egin ondoren, NaI-zkoa erabiltzea erabaki zen, iragazkia ondo garbituz gero, analisian arazo gutxien eragiten duena baita.

Material flotatzailea berreskuratzeko literaturan deskribatutako sistema desberdinak kontuan hartuta (Coppock et al., 2017; Imhof et al., 2012; Nakajima et al., 2019), lan honetan hainbat aukera probatu ziren (2. Irudia). Lehenengo hiru prototipoetan (A-C), MPak disoluzioaren gainezkatzearen bidez berreskuratzen ziren. Azken prototipoa (D) Nakajima et al., 2019-an proposatutako diseinuan oinarrituta dago, hainbat aldaketa egin ostean. 2. Irudiko lehenengo hiru prototipoen arazo nagusia zen partikula solido batzuk harrapatuta geratzen zirela muntaiaren leku estrategikoetan (gurutze gorriz markatutakoetan). Laugarren prototipoak ez zuen MPak gera zitezkeen eremurik aurkeztu eta prozesua azkarra eta garbia zen). Hau izan zen azkenean gure hautua urrats hau aurrera eramateko.

Urrats hau bukatutzat emateko flotazioaren bidez bereiztutako materiala (MPak, materia solido organiko zein ez-organiko) bereiztu behar da dentsitate altuko disoluziotik hutseango iragazketaren bidez. 45µm-ko iragazki metalikoa erabiltzen dugu horretarako. Garrantzitsua da iragazkina urarekin ondo garbitzea flotazioan erabilitako dentsitate altuko disoluzioaren hondakinak ahalik eta gehien eliminatzeko.



2. Irudia. MPak dentsitatearen arabera bereizteko erabilitako prototipoen argazkiak (arazoak ematen dituzten eremuak gurutze gorriez markatuta)

3.1.3. Iragazkian geratu den material solidoaren garbiketa

Lagin motaren arabera eta disoluzioan flotatzen duen materia organikoaren kopuruaren arabera, oxidatu egin behar da analisiari eragin diezaiokeen materia-kantitatea murrizteko. Betiere, plastikoen degradazioa kontuan hartuta.

Bibliografia berrikusi ondoren (Pfeiffer & Fischer, 2020), erabaki zen plastikoei ahalik eta gutxien eragingo zien zerbait erabiltzea, beti eta ahalik eta materia organiko gehien kentzea ahalbidetuko zuena. Horregatik, aurreko urratsetik lortutako iragazkia %30-ko ur oxigenatutan 12 ordutan tratatzea erabaki zen. Iragazkian zegoen materia organikoaren kantitatea oso handia izanez gero, aukera dago tratamendu gogorragoa egiteko, hots, 2 ordutan baina 40 °C-ko tenperatura altuagotan.

Garbiketaren ondoren MPak H_2O_2-zko disoluzio batean daude. Disoluzioa iragaziz lortu daiteke, tamaina desberdineko MPak banatzea eta isolatzea. Horretarako seriean jarritako sare-

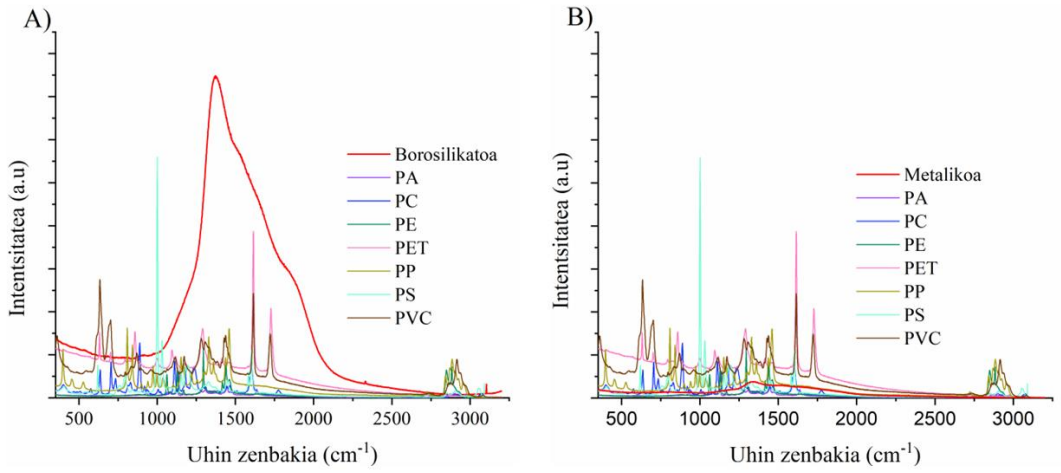
begi desberdineko hainbat iragazki metaliko erabiltzen ditugu, gehienetan, 5000, 1000, 200 eta 45 µm-koak.

3.1.4. Karakterizazio kimiko eta morfologikoa

MPek ezaugarri espezifikoak dituzte, hala nola konposizio kimikoa, tamaina, forma, dentsitatea, kolorea eta ugaritasuna. Oro har, MPen analisia bi eremu nagusitan bereiz daiteke: karakterizazio morfologikoa eta karakterizazio kimikoa.

MPen karakterizazio morfologikoa egiteko teknika plastikoaren tamainaren araberakoa da. 1mm baino handiagoak diren plastikoen kasuan begi hutsez egin daiteke eta 1mm baino gutxiagoak diren plastikoen kasuan mikroskopia optikoren bat erabili behar da.

MPen konposizio polimerikoa aztertzeko bi teknika espektroskopiko erabili ditugu: Fourier-en transformatuaren bidezko infragorrizko espektroskopia (FT-IR) eta Raman espektroskopia. Bi kasuetan lortutako espektroak alderatzen dira datu-baseetan eskuragarri dauden sustantzia puruen espektroekin. Teknika bakoitzaren ezaugarriak direla eta, FT-IR 1 mm baino handiagoko MPak analizatzeko aproposa da; Raman espektroskopiak, berriz, MP txikiagoak ere analizatzeko gaitasuna du. Raman espektroskopiaren kasuan garrantzitsua da aurreko urratsetatik gera daitezkeen NaI-zko hondakinak ahalik eta gutxien izatea (iragazkia ondo garbitu behar da). Iragazkiaren materiala ere garrantzitsua da, altzairuzko iragazki metalikoa aproposena delarik, interferentzia gutxien ematen duena delako. Izan ere, iragazkiaren materiala hautatzeko, hainbat proba egin ziren. Erabilitako iragazkiak borosilikatozkoak eta iragazki metalikozkoak izan ziren. Borosilikatozko iragazkien seinaleak interferentziak sortzen zituen MPen seinale nagusiak zeuden uhin-zenbaki berdinetan (3A. Irudia). Metalezko iragazkia, seinalea ematen zuen arren, txikiagoa zen, eta MPetako seinaleak bereiz zitezkeen (3B. Irudia) erraz. Horregatik, iragazki metalikoak erabiltzea erabaki zen.



3. Irudia. Zenbait plastikoren espektroak material desberdineko iragazkien espektroekin batera (gorriz): A) Borosilikatoa, B) Metalikoa.

3.2. Metodoaren balidazioa

Aurreko atalean proposatutako metodologia EUROqCHARM izeneko laborategien arteko ariketan (https://www.euroqcharm.eu/en) parte hartuz balioztatu zen. Laborategien arteko ariketa honen helburua ingurumen-laginetan plastikoen presentzia detektatzea eta haien egitura kimikoa determinatzea izan zen. 55 laborategik parte hartu zuten.

Aztertu beharreko lagin bat itsas sedimentua zen, Westerscheldtetik, Yerseketik (Herbehereak) gertu antolatzaileek hartua. Sedimentua sikatu ondoren, botila desberdinetan banatu zuten eta bakoitzari polietilenozko (PE-zko), polipropilenozko (PP-zko), polikarbonatozko (PC-zko) eta polibinil klorurozko (PVC-zko) 10na partikula (1 mm-ko diametroko esferak) gehitu zitzaizkien.

Botilak banatu zituzten laborategi parte hartzaileen artean (gure laborategia barne), bakoitzak bere metodoak erabiliz analiza zezan.

Laborategi bakoitzak emandako emaitzak onak ziren ala ez jakiteko, *z-scorea* (1. ekuazioa) erabili zen. Parametro honek emaitza bakoitza batezbestekotik zenbat urruntzen den adierazten du.

$$z_i = \frac{(\bar{x} - x_{pt})}{S_{pt}} \qquad \text{(1. ekuazioa)}$$

non $\bar{x}$ eta S_{pt} laborategien emaitzen batezbestekoa eta desbideratze estandarra diren, eta x_{pt} laborategiak emandako emaitza den. $z < |2|$ bada, emaitza ontzat eman daiteke, $2<|z|<3$ bada, emaitzak zalantzazkotzat jotzen dira eta $|z|>3$, emaitzak ez dira ontzat ematen.

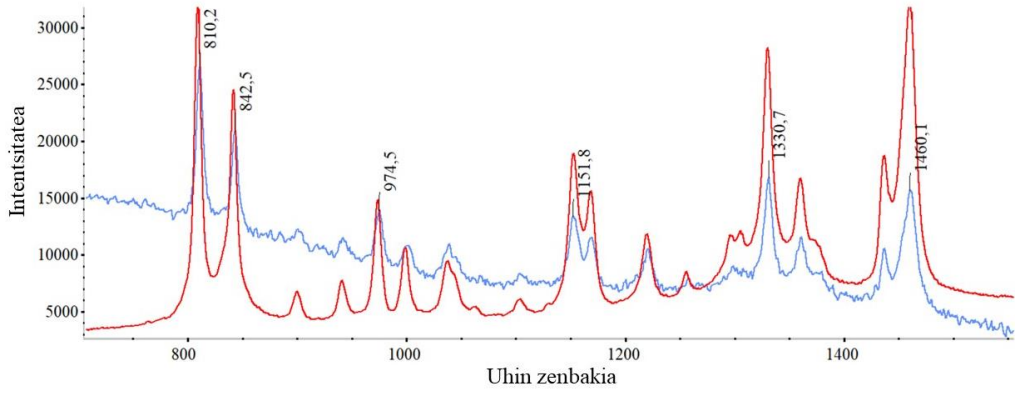
MP mota bakoitzaren kasuan, *z score* parametroan oinarrituta laborategien emaitzak 1. Taulan laburbildu dira. Aipatzekoa da MP guztietarako emaitzak eman dituzten laborategietatik (13) bik bakarrik eman zituztela emaitza onak, horien artean, gure laborategiak.

1. Taula. Laborategi arteko ariketan ikerketa-taldeek lortutako emaitzak.

	PE	PP	PC	PVC	PE, PP, PC eta PCV
Emaitzak eman dituzten laborategien kopurua	**30**	**20**	**15**	**18**	**13**
Emaitza onak eman dituzten laborategien kopurua	**19**	**11**	**11**	**13**	**2**
Gure laborategiak emandako *z-scorea*	**0.83**	**-0.84**	**-0.8**	**-1.29**	✓

3.3 Metodoaren aplikazioa lagin erreal batean

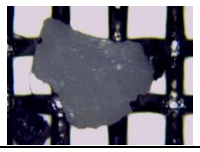
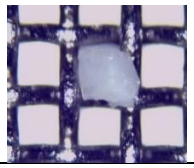
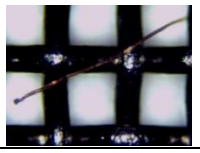
Metodoaren kalitatea balioztatu ondoren, euskal kostaldean bildutako sedimentu bat analizatzeko erabili zen. Laginketa Urdaibaiko UNESCOko Biosferako Erreserban dagoen Oka ibaiaren estuarioan egin zen. Laginak estuarioaren 6 puntu desberdinetan hartu ziren, laginketa-puntu bakoitzean 5 lata sedimentu bilduz. Gernikako araztegitik gertu dagoen puntuan jasotako 5 latetatik bat lehenago proposatu bezala tratatu eta aztertu zen. Analisian lortutako espektroak plastiko puruetako espektroekin konparatu ziren. Adibide modura, 4. Irudian analizatutako partikula baten espektroa (urdinez) ikus daiteke, PP puruari dagokion espektroarekin batera (gorriz).



4. Irudia. Raman espektroskopia bidez lortutako PPko espektroak 785 nm-ko laserrarekin. Gorriz, polipropileno puruari dagokion espektroa; urdinez, laginaren espektroa.

Guztira, hiru mikroplastiko aurkitu ziren: bat PE-zkoa, beste bat PP-zkoa eta azkena PET-zkoa (2. taula). PET-zko mikroplastikoa zuntz gorri bat zen, beste biak zati zuriak.

2. Taula. Analizatutako laginean aurkitu diren MP bakoitzaren izaera kimikoa, tamaina, kolorea eta argazkia.

	MOTA	TAMAINA	KOLOREA	ARGAZKIA
1	PE	250µm	Zuria	
2	PP	200µm	Zuria	
3	PET	450µm	Gorria	

4. Ondorioak

MPek eragindako kutsadurarekiko kezka areagotu egin da azken 50 urteetan, eta horrekin batera, MPen azterketa. Oraindik metodologia berriak sortzen ari dira ingurumenean dauden hainbat forma, mota eta tamainatako MP-sorta zabala bereizteko.

Laginketarako protokoloa kokalekuaren ezaugarrien araberakoa da. Protokolo horren arabera jasotzen den laginaren bolumena laborategian erraztasunez prozesatzeko modukoa da. NaI-zko disoluzioa, produktu garesti samarra izanik, berrerabiltzea komenigarria da. Horretarako, aldez aurretik, 1 µm-ko iragazkia bat erabiliz iragazi behar da, material solidorik ez daukala ziurtatzeko. Oxidazioaren atala zalantzazkoa da; izan ere, MPei lotutako kutsatzaile organikoak aztertu nahi badira, horiek ere oxidatu egingo dira. Beraz, beste metodo bat erabili behar da MPak bakarrik isolatzeko. Azkenik, Raman analisia eraginkorra da, azkarra eta ez-suntsitzailea izateaz gain, MPko tamaina, forma eta kolorea aztertzeko erabil daiteke irudia. Kontuan hartu behar da lagina ondo garbituta egon behar dela, MPen seinaleekin interferentziarik sor ez dadin.

5. Etorkizunerako planteatzen den norabidea

Lan horretatik abiatuta, etorkizunerako planteatzen den erronka nagusia MPen eta horiei lotutako kutsatzaile organikoen egoera aztertzea da, kostaldeko eremuetan, estuarioetan eta Euskal Kostaldeko ur gezaren ingurunetan. Horretarako, beharrezkoa da MPen banaketa ezagutzea eta, beraz, laginak batzen jarraituko dugu Euskal Kostaldeko hainbat tokitan. Isolatutako MPak karakterizatu eta kuantifikatu ere egingo dugu, eta horiei lotutako kutsatzaile kimiko organikoen kontzentrazioa neurtu.

6. Erreferentziak

Alprol, A. E., Gaballah, M. S., & Hassaan, M. A. (2021). Micro and Nanoplastics analysis: Focus on their classification, sources, and impacts in marine environment. *Regional Studies in Marine Science*, *42*, 101625. https://doi.org/10.1016/j.rsma.2021.101625

Bakir, A., Rowland, S. J., & Thompson, R. C. (2012). Competitive sorption of persistent organic pollutants onto microplastics in the marine environment. *Marine Pollution Bulletin*, *64*(12), 2782–2789. https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2012.09.010

Barnes, D. K. A., Galgani, F., Thompson, R. C., & Barlaz, M. (2009). Accumulation and fragmentation of plastic debris in global environments. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, *364*(1526), 1985–1998. https://doi.org/10.1098/rstb.2008.0205

Calcutt, J., Nussbaumer, A., & Sluka, R (2018). Guidelines for Sampling Microplastics on Sandy Beaches. *The microplastcis toolbox.* A Rocha International. (London)

Campanale, C., Savino, I., Pojar, I., Massarelli, C., & Uricchio, V. F. (2020). A Practical Overview of Methodologies for Sampling and Analysis of Microplastics in Riverine Environments. *Sustainability*, *12*(17), 6755. https://doi.org/10.3390/su12176755

Coppock, R. L., Cole, M., Lindeque, P. K., Queirós, A. M., & Galloway, T. S. (2017). A small-scale, portable method for extracting microplastics from marine sediments. *Environmental Pollution*, *230*, 829–837. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.07.017

Gestoso, I., Cacabelos, E., Ramalhosa, P., & Canning-Clode, J. (2019). Plasticrusts: A new potential threat in the Anthropocene's rocky shores. *Science of The Total Environment*, *687*, 413–415. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.06.123

Guo, X., & Wang, J. (2019). The chemical behaviors of microplastics in marine environment: A review. *Marine Pollution Bulletin*, *142*, 1–14. https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2019.03.019

Hanvey, J. S., Lewis, P. J., Lavers, J. L., Crosbie, N. D., Pozo, K., & Clarke, B. O. (2017). A review of analytical techniques for quantifying microplastics in sediments. *Analytical Methods*, *9*(9), 1369–1383. https://doi.org/10.1039/C6AY02707E

Hidalgo-Ruz, V., Gutow, L., Thompson, R. C., & Thiel, M. (2012). Microplastics in the Marine Environment: A Review of the Methods Used for Identification and Quantification. *Environmental Science & Technology*, *46*(6), 3060–3075. https://doi.org/10.1021/es2031505

Imhof, H. K., Schmid, J., Niessner, R., Ivleva, N. P., & Laforsch, C. (2012). A novel, highly efficient method for the separation and quantification of plastic particles in sediments of aquatic environments: Novel plastic particle separation method. *Limnology and Oceanography: Methods*, *10*(7), 524–537. https://doi.org/10.4319/lom.2012.10.524

Nakajima, R., Tsuchiya, M., Lindsay, D. J., Kitahashi, T., Fujikura, K., & Fukushima, T. (2019). A new small device made of glass for separating microplastics from marine and freshwater sediments. *PeerJ*, *7*, e7915. https://doi.org/10.7717/peerj.7915

Pfeiffer, F., & Fischer, E. K. (2020). Various Digestion Protocols Within Microplastic Sample Processing—Evaluating the Resistance of Different Synthetic Polymers and the Efficiency of Biogenic Organic Matter Destruction. *Frontiers in Environmental Science*, *8*, 572424. https://doi.org/10.3389/fenvs.2020.572424

Rocha-Santos, T., & Duarte, A. C. (2015). A critical overview of the analytical approaches to the occurrence, the fate and the behavior of microplastics in the environment. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, *65*, 47–53. https://doi.org/10.1016/j.trac.2014.10.011

Stock, F., Kochleus, C., Bänsch-Baltruschat, B., Brennholt, N., & Reifferscheid, G. (2019). Sampling techniques and preparation methods for microplastic analyses in the aquatic environment – A review. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, *113*, 84–92. https://doi.org/10.1016/j.trac.2019.01.014

Van Cauwenberghe, L., Devriese, L., Galgani, F., Robbens, J., & Janssen, C. R. (2015). Microplastics in sediments: A review of techniques, occurrence and effects. *Marine Environmental Research*, *111*, 5–17. https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2015.06.007

Wang, F., Wong, C. S., Chen, D., Lu, X., Wang, F., & Zeng, E. Y. (2018). Interaction of toxic chemicals with microplastics: A critical review. *Water Research*, *139*, 208–219. https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.04.003

Wright, S. L., Rowe, D., Thompson, R. C., & Galloway, T. S. (2013). Microplastic ingestion decreases energy reserves in marine worms. *Current Biology*, *23*(23), R1031–R1033. https://doi.org/10.1016/j.cub.2013.10.068

7. Eskerrak eta oharrak

- Lan honek Espainiako Gobernuaren finantzarioa izan du, "PLASTeMER" (Erref.: PID2020-118685RB-I00) eta Eusko Jaurlaritzarena, "IBeA, 2022-2024 Ikerketa Talde Kontsolidatua " proiektuaren bidez (Erref.: IT1446-22)
- U. Uribek doktoratu aurreko kontratua eskertu nahi dio IBeA (Ikerkuntza eta Berrikuntza Analitikoa) UPV/EHUko Kimika Analitikoa Saileko ikerketa taldeari.

Mendiko larreetako polinizatzaileen bazka-portaera aldaketak denbora eta espazioan

Maddi Artamendi[1,2], Ainhoa Magrach[1], Arantza Aldezabal[2], Paula Domínguez-Lapido

[1]Basque Centre for Climate Change (BC3), [2]Euskal Herriko Unibertsitatea (EHU)
maddi.artamendi@ehu.eus

Laburpena

Bizidunen arteko elkarrekintzak biodibertsitatearen egituraren funtsa dira eta sare ekologiko konplexu eta dinamikoak sortzen dituzte. Landare-polinizatzaile sare mutualistak landareen ugal arrakastaren sostengu dira. Elkarrekintza sare hauek ez dira estatikoak eta denboran eta espazioan bereizirik aztertu behar dira. Horregatik, ikerketa honen helburu nagusia Gorbea Parke Naturaleko landare-polinizatzaile sare mutualistaren aldakortasun espazio-tenporalak aztertzea da, aldakortasunean eragiten duten faktore desberdinak topatuz. Ikerketa honetan, dinamikotasun hau baieztatzeaz gain, polinizatzaileen bazka-portaeretan momentuko landare baliabideen ugaritasunak bai eta polinizatzaileek lehiakideekiko dituzten elkarrekintzek eragina dutela ikusi da.

Hitz gakoak: Sare mutualistak, polinizazio entomofiloa, lore-intsektu elkarrekintzak, bikote-leialtasuna, bazka-portaerak, komunitate dinamikak.

Abstract

Interactions between living organisms are the basis of the structure of biodiversity and create complex and dynamic ecological networks. In particular, plant-pollinator mutualistic networks support the reproductive success of plants. These interaction networks are not static and should be studied over space and time. Therefore, this study aimed to explore the dynamics of the mutualist plant-pollinator network in the Gorbea Natural Park, identifying the different factors that affect its variability. In addition to confirming the dinamic nature of these networks, the study has shown that the abundance of plant resources at each moment and that pollinators´ interactions with competitors have an impact on the foraging behaviour of pollinators.

Keywords: mutualistic networks, entomophile pollination, plant-insect interaction, partner fidelity, foraging behaviour, community dinamycs.

1. Sarrera eta motibazioa

Biodibertsitatea ez dago soilik indibiduo desberdinen identitateaz eta euren abundantziaz osatuta, espezie hauek elkarrekiko dituzten harreman eta interakzioez osatuta dago ere (CaraDonna eta Waser, 2020). Espezie guztiak beste espezie batzuekin harremantzen dira sare antagonista (adib. : harrapari-harrapakin) edo mutualista (adib.: landare-polinizatzaile) konplexuak eratuz (Tylianakis et al., 2010). Honela, habitat baten barnean bertako espezieek sare ekologiko handi eta konplexuak osatzen dituzte, zeintzuk ekosistema beraren funtzioen orekaren funtsa diren.

Kinzig eta Pacala-ren arabera (2002), ekosistemen funtzioak hiru taldetan sailkatzen dira: materiaren eta energiaren erreserbak (adib. : biomasa), energia fluxuak edo materiaren prozesatzea (adib. : deskonposaketa, produkzioa) eta tasa hauen eta erreserben egonkortasuna mantentzea denboran zehar. Funtzio hauen egonkortasuna ekosistema batek duen erresilientzia moduan neurtzen da, hau da, asalduren ostean ekosistemak aurretiko egoera egonkorrera itzultzeko duen gaitasun moduan (Srivastava eta Vellend, 2005). Biodibertsitateak ekosistemen funtzionamendu eta erresilientzian duen rola oso ikertuta izan da urteetan zehar espezieen suntsipen-tasa gero eta handiagoek eraginda (Coux et al., 2016).

Hala ere, ikerketak espezieen dibertsitatean zentratuak izan dira nagusiki, interakzio sareen egitura alde batera utziz. Espezieak egotea baldintza ezinbestekoa da elkarrekintzak eman daitezen; hala ere, interakzioak galdu daitezke espezierik galdu gabe. Hain zuzen, interakzioen galera espezie galeraren eragile bat da, izan ere, erlazio biotikoak komunitatearen egituraren gako baitira (Trøjelsgaard et al.,

2015). Egoera honetan, komunitate baten barneko prozesu funtzionaletan (adib. : deskonposaketa tasa, energia fluxua, produktibitatea) espezieen arteko interakzio kopuruak, identitateak eta indarrak nola eragiten duten ulertzea oinarrizko ikerketa gaia da gaur-egun ekologian eta kontserbazioaren ikerketan (Tylianakis et al., 2010, Coux et al., 2016, Arceo-Gómez et al., 2020). Gainera, zenbait ikerketek aditzera eman dute aldaketa antropogenikoek interakzio-sareen egituran asaldurak eragiten dituztela nahiz eta espezie dibertsitatean aldaketarik ez eman (Tylianakis et al., 2010). Hau dela eta, interakzioen dibertsitate galerak eragin garrantzitsuak ditu sare trofikoan zeharreko energia fluxuan eta ekosistemen prozesuetan (Brose eta Hillebrand, 2016).

Azken urteetan komunitate mutualisten interakzio sareen egitura askoz gutxiago aztertu da komunitate antagonistena baino (adib. harrapari-harrapakin sareak). Ikerketan eta ezagutzan dagoen hutsune hau larria da, izan ere, interakzio mutualistak funtsezkoak dira biodibertsitatea mantentzeko eta zerbitzu ekologiko garrantzitsuak sostengatzeko, zeintzuk gero eta mehatxatuagoak dauden giza jardueren eraginagatik (Arceo-Gómez et al., 2020). Klima-aldaketak, espezie inbaditzaileek, urbanizazioaren handitzeak eta nekazaritzaren intentsifikazioak presio handia eragiten dute landare-polinizatzaile sare mutualisten egituran eta funtzionamenduan, kolokan jarriz mantentzen dituzten zerbitzu ekosistemikoak (Bascompte et al., 2019; Magrach et al., 2017; Parra et al., 2022; Trøjelsgaard et al., 2019).

Polinizatzaile-landare elkarrekintzetan, polinizatzaileak polenaz elikatzen dira eta era berean polen hori landarez landare barreiatzen dute, landareen ugalketarako ezinbesteko bilakatuz. Laborantza landare zein landare basati diren espezieen ehuneko altu batek animali polinizatzaileen beharra dute ugaldu ahal izateko (landare basatien %85 Ollerton et al., 2011; eta laborantza landareen >%70 Klein et al., 2007). Hortaz, animali bidezko polinizazioa funtsezkoa da landare espezie ugarirentzat, landare populazioen eta komunitateen dinamiketan eragin zuzena edukiz (Trøjelsgaard et al., 2019).

Azken hamarkadetan, mundu osoan zehar polinizatzaileen populazioen gainbehera hauteman da, zenbait lekutan espezie batzuk jadanik desagertu egin direlarik giza jardueren eraginagatik (Potts et al., 2010; Magrach et al., 2021). Gainbehera honen aurrean eta nekazal guneen intentsifikazioaren aurrean, ezti erlearen (*Apis mellifera*) erabilera handitu egin da nekazaritza ekoizpena emendatu nahian (~%85 handitu dira espezie honetako erlauntzak 1961tik, FAOSTAT 2020). Bestalde, zenbait ikerketek aditzera eman dute ezti erleek erle basatien populazioen gainbeheran eragiten dutela, bazkagatik lehiatzen baitira (Herbertsson et al., 2016; Magrach et al., 2017). Gainera, lehiak eragindako polinizatzaileen dieta aldaketak ez du soilik polinizatzaileen dinamiketan eragiten, baizik eta landare basatien ugal arrakasta ere murriztu dezake (Magrach et al., 2017). Erle basatiek laborantza-landareen ugal arrakastan duten eraginari ez zaio behar besteko garrantzirik eman (Klein et al., 2007). Hortaz, guzti honek, polinizazio zerbitzuaren galerari aurre egiteko ezti erlearengan dagoen konfidantza kolokan jartzen du.

2. Arloko egoera eta ikerketaren helburuak

Sare ekologiko bat espezie ugarik sortzen dituzten interakzioen errepresentazio matematiko eta kontzeptuala da. Interakzioen inguruko literaturak orokorrean sareak objektu estatikotzat hartzen ditu (Poisot et al., 2015). Izan ere, orain arte sare ekologikoen inguruan egin diren ikerketa ugarik denboran eta espazioan jasotako datuak modu bateratuan landu dituzte (Timothée et al., 2015). Esplizituki esanda, bi espeziek eremu edo leku geografiko batean interakzionatzen badute, edozein leku eta denboratan interakzionatuko dutela onartzen da, albo batera utziz inguruneko aldagaiek, espeziaren bizi etapak eta komunitatea beraren egiturak izan ditzaketen eraginak (Poisot et al., 2015). Hau dela eta, bateratutako datuek informazioaren galtzea dakarte, espezieen interakzioen berezko dinamika jakina izanik (Timothée et al., 2015).

Berrikiago ordea, sare ekologikoak objektu dinamikotzat hartu dira. Izan ere, interakzioak ez baitira estatikoak, dinamikoak dira eta inguruko aldaketei erantzuten diete, aldakorrak izanik denboran zehar eta baita lekuaren arabera ere, bizidun askok adinarekin bere dieta eta portaera aldatzearekin eta urtaroek aurrera egitearekin batera (CaraDonna eta Waser, 2020). Komunitateen ekologian oso garrantzitsua da ulertzea nola interakzionatzen duten espezieek iragarpen-modeloak egin ahal izateko (Poisot et al., 2015).

Testuinguru honetan, polinizatzaileen bazka-portaera (zein landare espezierekin interakzionatzen duten) aldakorrak eta dinamikoak dira, faktore ugarik eragin dezakete eta euren elikagai lehentasunetan. Landare-polinizatzaile bikote-leialtasuna, interakzionatzen duen bikote batek topo egiten duen aldioro berriro ere interakzionatzeko duen joera da (Parra et al., 2022). Polinizatzaile-sareetan bikote-leialtasuna zehazten duten patroiak ulertzea garrantzitsua da etorkizuneko aldaketek ekarriko dituzten ondorioak aurreikuste aldera (Parra et al., 2022). Hala ere, bazka-portaeren dinamikak ikertu dituzten ikerketa gehienak laborategiko esperimentuak izan dira, denbora-tarte oso laburretan polinizatzaile indibiduo berdinek dituzten portaera aldaketak neurtuz (Vaudo et al., 2014). Hau da, komunitatearen dinamikak albo batera utzi dira.

Lan honetan zehazki, bazka-portaera bi aldagairen bidez deskribatu da: bikote-leialtasuna eta polinizatzaileen hegaldi bakoitzean bisitaturiko lore dibertsitatea. Aipaturiko guztia kontutan edukita eta sare mutualisten dinamikotasunean oraindik ere dagoen ezagutza hutsunea ikusita, ikerketa honetan udaberriko loraldian zehar eta urtetik urtera polinizatzaileen bazka-portaeran dauden aldaketak ezagutu nahi dira. Gure ikerketaren helburu zehatzak honakoak dira:

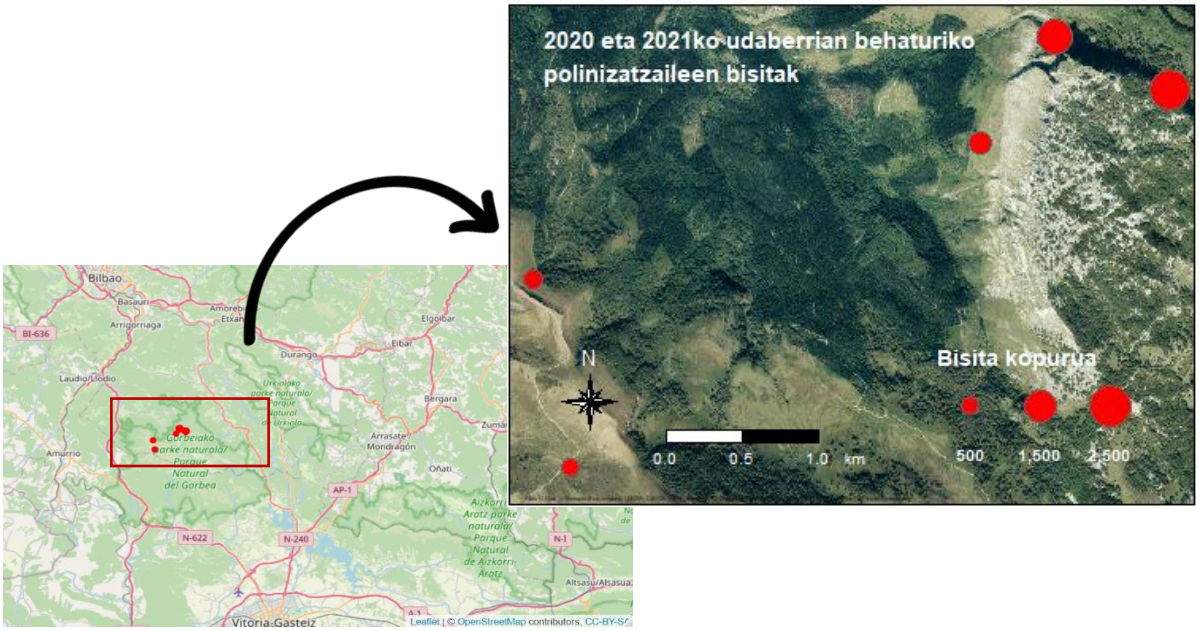
1) Landare-polinizatzaileen interakzio sarean dauden aldaketak ezagutzea urtetik urtera eta udaberri berdineko loraldi momentu desberdinetan.
2) Polinizatzaileek bisitatutako landare espezie sekuentzian oinarrituta bikote-leialtasuna zehaztea polinizatzaile espezie bakoitzaren kasuan.
3) Bazka-portaeran eragina duten faktoreen azterketa; bai espezie mailako faktoreak (landare espezie bakoitzeko lore abundantzia, polinizatzaile espezieen aberastasuna, landare espezieen aberastasuna, landare espezie mailako lehia) eta bai komunitate mailakoak (lore abundantzia totala, polinizatzaileen arteko lehiakortasuna).

3. Ikerketaren muina

3.1. Laginketa diseinua

Ikerketa hau Gorbeiako Parke Naturalaren bost puntutan burutu da (1.Irudia). Datuak 2020 eta 2021ko udaberrian zehar bildu ziren, udaberriko loraldian zehar Apirila-Uztaila hasiera bitartean. Laginketa puntu bakoitzean 25m x 25m-ko karratu bat kokatu zen eta bertako lore-baliabideak zehaztu ziren loraldian zehar, 2020an loraldiko bi momentutan eta 2021ean hiru momentutan. Lore-baliabideak zehazteko metro karratu bakoitzean landare espezie bakoitzeko lore kopurua zehaztu zen, eskala espazial txikian dagoen aldakortasuna kontutan edukitzeko eta landareen agregazio espaziala ezagutzeko.

1.Irudia. Laginketa eremuen lokalizazioak Gorbeako Parke Naturalean.



Bestalde, laginketa puntu bakoitzera hurbildu ginen aldiro, karratu handian zehar oinez ibilita ikusitako polinizatzaile bisita bakoitza jarraitu genuen; honela, polinizatzaileak egindako lore bisita sekuentzia jarraituz (ikusiz lore bisiten ordena). Komunitate mailan polinizatzaileek duten bikote-leialtasuna, polinizatzaile batek hurrenez hurren bisitaturiko bi lore espezie berekoak izateko probabilitate moduan neurtu zen. Bikote-leialtasuna espezie mailaraino zehaztu zen ere, polinizatzaile espezie bakoitzak landare espezie bakoitzarekiko duen leialtasuna zehaztuz. Landa eremuan identifikatu ezin ziren polinizatzaileak taxonomo batek laborategian identifikatzeko jasotzen ziren.

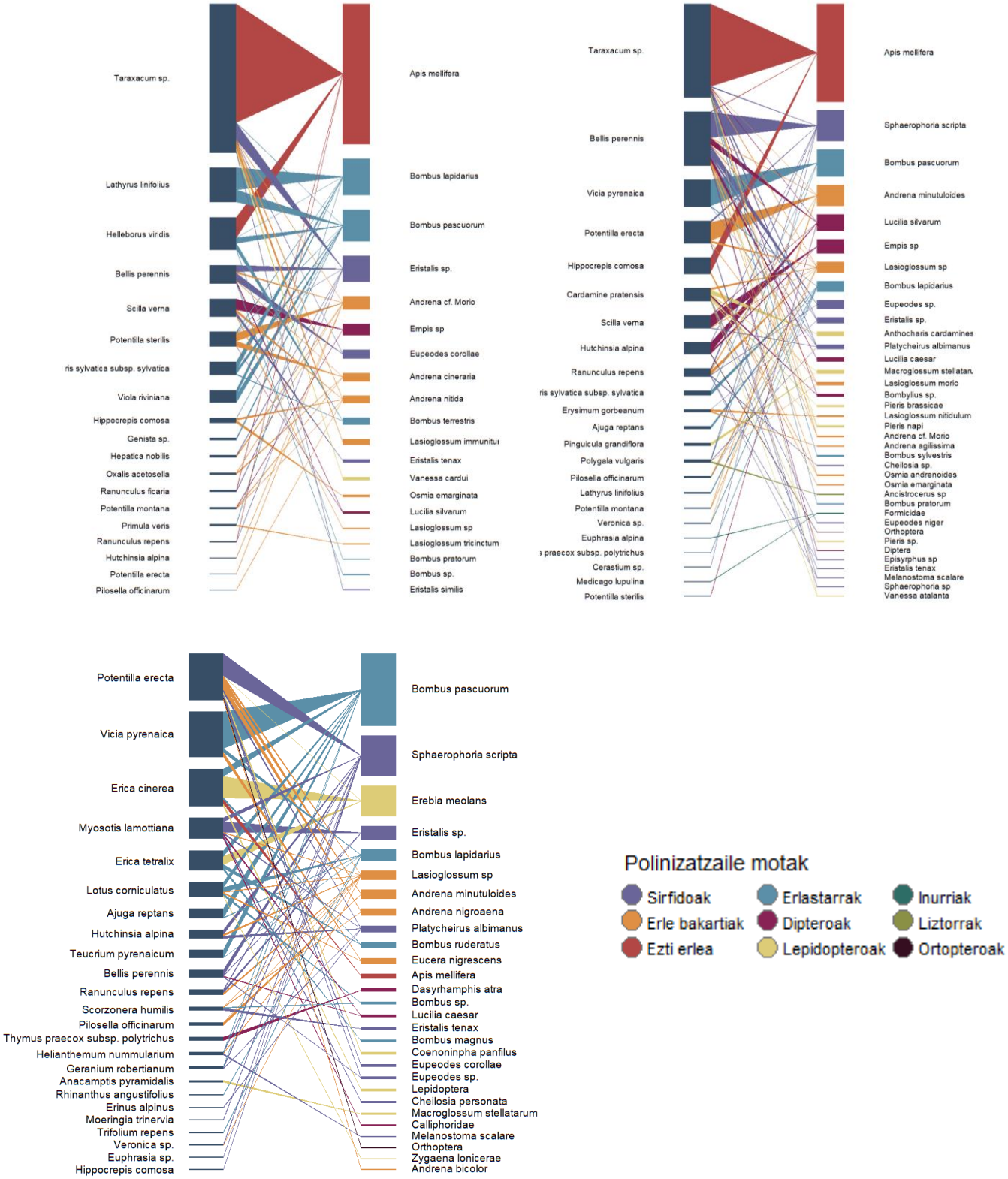
3.2 Emaitzak

Lehendabizi, polinizatzaileen bazka-portaera adierazteko eta bisualki ikusteko, urte eta udaberriko periodo bakoitzerako landare-polinizatzaile sare mutualistak eraiki ziren R 4.2.1 software-ko “bipartite” paketearen bidez (Dormann et al., 2008). Sare hauetatik polinizatzaileen ustezko lehiakortasuna kalkulatu zen “PAC” funtzioaren (Potential for Apparent Competition) bidez. Honek, polinizatzaile bikote bakoitzerako konpetentzia indize bat ematen du bakoitzak egiten dituen interakzioetan oinarriturik. Ondoren, polinizatzaile bakoitzerako ustezko lehiakortasun indizea atera zen bikote aukera guztien indizeen batezbestekoa ateraz. Horrela, komunitate mailan polinizatzaileek elkarrekiko duten lehia adierazten da, euren bazka-portaeran eragin dezakeena.

Interakzio sareei dagokiela, urtetik urtera eta udaberrian zehar oso aldakorrak direla ikusi da (2. eta 3. Irudiak). Behaturiko interakzioetan ikusten da, udaberriko momentu bakoitzean espezie jakin batzuk (bai landare eta bai polinizatzaile) nagusitzen direla gerora berriro euren aktibitatea jaitsiz eta beste batzuena igoz. Gainera, interakzioen gehiengoa espezie jakinen artean gertatzen dela ikusten da, espezie ugari interakzio gutxi batzuk baino ez burutuz. Horretaz gain, polinizatzaile batzuk landare espezie ugari bisitatu baditzakete ere, bisitatzen dituzten lore gehienak espezie gutxi batzuetakok dira. Bestalde, ezti erlearen aktibitatea 2021ean askoz ere altuagoa izan da 2020an baino, agian inguruan erlauntzaren bat jarri izanaren ondorioz.

2.Irudia. 2020-ko udaberriko sare mutualistak bi denboraldi desberdinetan. Espezieen zutabeen tamainak behatu diren interakzio kopurua adierazten du eta interakzio loturak polinizatzaileetatik (eskuin) landareetara (ezker) irudikatu dira.

3.Irudia. 2021-ko udaberriko sare mutualistak hiru denboraldi desberdinetan. Espezieen zutabeen tamainak behatu diren interakzio kopurua adierazten du eta interakzio loturak polinizatzaileetatik (eskuin) landareetara (ezker) irudikatu dira.



Polinizatzaileen bazka-portaeretan eragin dezaketen beste zenbait aldagai kalkulatu dira ere. Lehendabizi landare eta polinizatzaileen aberastasuna kalkulatu da, urteko, udaberri momentuko eta laginketa eremu bakoitzerako dagoen espezie kopuru moduan. Landareei dagokiela, metro karratu

bakoitzeko agregazio espazialeko datuak ditugunez, Moran I agregazioa indizea kalkulatu zen espezie bakoitzerako "Ape" paketeko "moran" funtzioarekin (Paradi eta Schliep, 2019). Gainera, espezie mailako lehiaren adierazle moduan, landare espezie bakoitza momentu jakinean zenbat polinizatzaile espeziek bisitatzen duten kalkulatu zen ere.

Ateratako indizeek bazka-portaeran eraginik al duten ikusteko GLMM-ak burutu ziren "lme4" paketearekin. Komunitate mailako bazka-leialtasunari dagokiola, eragin negatiboa dute bai landareen espezie kopuruak zein polinizatzaileen arteko lehiakortasunak (1.Taula). Hau da, polinizatzaileek bazka-baliabideekiko (loreekiko) duten lehiak eragin negatiboa du polinizatzaileen leialtasunean. Espezie mailan, landare espezie aberastasuna handitzean polinizatzaileen leialtasuna txikitzen da. Gainera, landare espezie bat gero eta polinizatzaile espezie gehiagok bisitatu (espezie mailako lehia handitu), polinizatzaile hauen leialtasuna handiagoa izatea eragiten du. Azkenik, gero eta landare espezie bakoitzeko lore gehiago egon, are eta leialagoak izango dira polinizatzaileak.

1.Taula. 2020-2021ko datuen (N=4691 behaketa) GLMM-aren emaitzak, goian komunitate mailako bikote-leialtasun portaeran eragiten duten aldagai finkoen balioak adierazten dira eta behean espezie mailakoak. Laginketa puntua, udaberri momentua urteka eta polinizatzailea zorizko aldagai moduan ezarrita.

Aldagaiak komunitate mailan	**E.S**	**z**	**p**
Polinizatzaile aberastasuna	0,476	0,583	0,559
Landare aberastasuna	0,703	-2,132	**0,033**
Polinizatzaileen ustezko lehiakortasuna	0,5409	-3,109	**0,002**
Landareen lore abundantzia totala	0,53	-0,763	0,445
Aldagaiak espezie mailan			
Polinizatzaile aberastasuna	0,515	1,578	0,115
Landare aberastasuna	0,344	-7,380	**<0,001**
Landareen Moran agregazioa	0,480	1.808	0,070
Landare espezie mailako lehia	0,397	2,719	**0,007**
Landare espezie bakoitzeko lore abundantzia	0,375	4,633	**<0,001**

Azkenik, polinizatzaileen hegaldi batean bisituturiko landare espezie kopurua handiagoa da inguruko landare aberastasuna handiagoa denean eta baita polinizatzaileen arteko bazka lehia handiagoa denean (2.Taula).

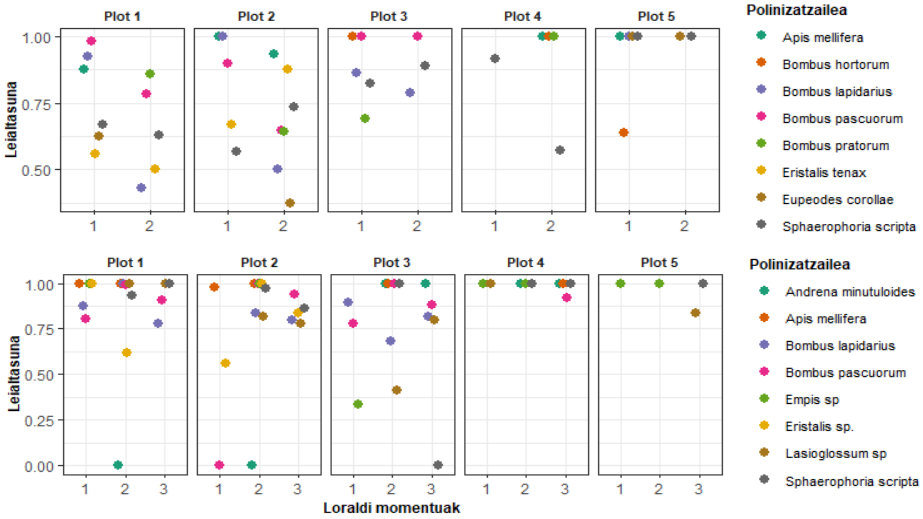
2.Taula. 2020-2021ko datuen (N=5895 behaketa) GLMM-aren emaitzak, polinizatzaile baten hegaldi batean bisitatzen diren landare desberdin kopuruan eragiten duten aldagai finkoen balioak adierazten dira. Laginketa puntua, udaberri momentua urteka eta polinizatzailea zorizko aldagai moduan ezarrita.

Aldagaiak	**E.S**	**z**	**p**
Polinizatzaile aberastasuna	0,114	1,154	0,248
Landare aberastasuna	0,143	3,059	**0,002**
Polinizatzaileen ustezko lehiakortasuna	0,122	3,514	**<0,001**
Landareen lore abundantzia totala	0,138	-0,069	0,945

Bestalde, leialtasun portaera polinizatzaile espeziearen arabera oso aldakorra da udaberriko loraldian zehar eta baita urtetik urtera ere (4. Irudia). Aipatzekoa da ezti erlearen bazka-leialtasuna gutxien aldatzen dena dela, bestelako espezieei udaberriko denboraldiak gehiago eragiten dien bitartean. Gainera, 4.irudian Gorbeako Parke Naturalean bertan polinizatzaileen bikote-leialtasunean dagoen

aldakortasun espaziala ageri da, laginketa puntu batzuk (plot 4 eta plot 5) denboran zehar egonkorragoak izanik. Orohar, polinitzaileek portaera malgua dutela ikusten da, tokian-tokiko lore baliabideen araberakoa izanik.

4.Irudia. 2020 eta 2021ko polinizatzaile ugarienen bikote-leialtasun portaera



4. Ondorioak

Ikerketa honen emaitzek ekosistema bateko sare trofikoen konplexutasuna eta aldakortasuna adierazten dute. Espezieek momentu eta lekuaren arabera elkarrekintza desberdinak dituztela baieztatuz. Hau da, bi espeziek ez dute beti modu berdinean interakzionatuko, eta honetan eragin zuzena izan dezake polinizatzaileen arteko lehiak edota landare-baliabideetan egon daitekeen aldakortasuna urtaroan zehar. Hain zuzen, lan honek ondorioztatzen du landare aberastasun eta abundantziaz gain, ekosisteman aurkitzen diren polinizatzaileen arteko bikote lehiak eragin zuzena duela polinizatzaileek izango duten bazka-portaeran. Elikadura optimizatzearen teoriak landare espezie baten abundantziak polinizatzaileen portaeran eragin zuzena duela dio, energia kontsumoa handitzeko helburuarekin (Spiesman eta Gratton, 2016). Bestalde, ikerketa honetan, polinizatzaile aberastasun eta abundantziak sortutako lehiaz gain, sarea osatzen duten polinizatzaileek elkarrekiko dituzten elkarrekintza motak eta kopuruak bazka-portaerak modulatzen dituztela ikusi da. Gainera, ikusi da 2021 urtean *Apis mellifera* erlauntzak ezarri dituztela inguruan eta honek eragina izan duela sarearengan, egitura zehatzean eta indize jakinetan sakondu gabe. Ezti erleek erle basatien gainbehera ekar dezaketenez (Magrach et al., 2017), honako datu hau oso adierazgarria da.

5. Etorkizunerako planteatzen den norabidea

Polinizatzaile-landare elkarrekintzen aldakortasunean eragiten duten patroiak gehiago zehaztu beharko lirateke. Polinizatzaile eta landareak morfologikoki sailkatzea interesgarria litzateke, patroirik al dagoen ikusteko. Bestalde, bazka-portaeren aldakortasunak landareen ugalkortasun arrakastan izan dezakeen eragina neurtu daiteke. Honetarako, landare espezie berdinak loraldiko momentu desberdinetan sortzen dituen fruitu kopuru edo hazi kopurua kuantifikatu beharko lirateke. Amaitzeko, ezti erleak sarearen egituran izan duen eragina sakonago aztertu beharko litzateke, honetarako sarearen indize eta ezaugarri desberdinak aztertuz.

6. Erreferentziak

Arceo-Gómez, G., Barker, D., Stanley, A., Watson, T. eta Daniels, J. (2020): Plant–pollinator network structural properties differentially affect pollen transfer dynamics and pollination success, *Oecologia*,192, 1037-1045.

Bascompte, J., García, M.B., Ortega, R., Rezende, E.L. eta Pironon, S. (2019): Mutualistic interactions reshuffle the effects of climate change on plants across the tree of life, *Sci. Advances*, 5, 1-8.

Brose, U. eta Hillebrand, H. (2016): Biodiversity and ecosystem functioningin dynamic landscapes, *Philosophical Transactions Royal Society B,* 371.

CaraDonna, P.J. eta Waser, N.M. (2020): Temporal flexibility in the structure of plant–pollinator interaction networks, *OIKOS,* 129, 1369-1380.

Coux, C. Rader, R., Bartomeus, I. eta Tylianakis, J.M. (2016): Linking species functional roles to their network roles, *Ecology Letters,* 19, 762-770.

Dormann, C.F., Gruber, B. eta Fruend, J. (2008): "Introducing the bipartite Package: Analysing Ecological Networks." *R News*, 8(2), 8-11.

FAOSTAT. (2020): http://www.fao.org/faostat/en/#data

Herbertsson, L., Lindström, S.A.M., Rundlöf, M., Bommarco, R. eta Smith, H.G. (2016): Competition between managed honeybees and wild bumblebees depends on landscape context, Basic and Applied Ecology, 17,609-616.

Kinzig, A.P., Pacala, S. eta Tilman, D. (2002): *The Functional Consequences of Biodiversity: Empirical progess and theoretical extensions,* Princeton University Press, Princeton.

Klein, A.M., Vaissière, B.E., Cane, J.H., Steffan-Dewenter, I., Cunningham, S.A., Kremen, C., et al. (2007): Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.*

Magrach, A., González-Varo, J.P., Boiffier, M., Vilà, M. eta Bartomeus, I. (2017): Honeybee spillover reshuffles pollinator diets and affects plant reproductive success, *Nature Ecology & Evolution*,1-9.

Magrach, A., Molina, F.P. eta Bartomeus, I. (2021): Niche complememtarity among pollinators increases community-level plant reproductive success, *Peer Community Journal*, 1-37.

Ollerton, J., Winfree, R. eta Tarrant, S. (2011): How many flowering plants are pollinated by animals? *OIKOS*,120, 321-326.

Paradi, E. eta Schliep, K. (2019):"ape 5.0: an environment for modern phylogenetics and evolutionary analyses in R." *Bioinformatics*, 35, 526-528.

Parra, S., Thébault, E., Fontaine, C. eta Dakos, V. (2022): Interaction fidelity is less common than expected in plant-pollinator communities, *Journal of Animal Ecology,* 91, 1842-1854.

Poisot, T., Stouffer, D.B. eta Gravel, D. (2015): Beyond species: why ecological interaction networks vary through space and time, *OIKOS,* 124, 243-251.

Potts, S.G., Biesmeijer, J.C., Kremen, C., Neumann, P., Schweiger, O. eta Kunin, W.E. (2010): Global pollinator declines: Trends, impacts and drivers, *Trends Ecol. Evol.,* 25, 345–353.

Spiesman, B.J. eta Gratton, C. (2016): Flexible foraging shapes the topology pf plant-pollinator interaction networks, *Ecology,* 97, 1431-1441.

Srivastava, D.S. eta Vellend, M. (2005): Biodiversity-ecosystem function research: Is it relevant to conservation?, *Ecology and Evolution,* 36, 267-294.

Timothée P, B. SD eta Dominique G.(2015): Beyond species: why ecological interaction networks vary through space and time, *OIKOS,* 124, 243–51.

Trøjelsgaard, K., Jordano, P., Cartensen, D.W. eta Olesen, J.M. (2015): Geographical variation in mutualistic networks:similaruty, turnover and partner fidelity, *Proc. R. Soc. B,* 282, 1-9.

Trøjelsgaard, K., Heleno, R. eta Traveset, A. (2019): Native and alien flower visitors differ in partner fidelity and network integration, *Ecology Letters,* 22, 1264-1273.

Tylianakis, J.M., Laliberté, E., Nielsen, A. eta Bascompte, J. (2010): Conservation of species interaction networks, *Biological Conservation,* 143, 2270-2279.

Vaudo, A.D., Patch, H.M., Mortensen, D.A., Grozinger, C.M. eta Tooker, J.F. (2014): Bumble bees exhibit daily behavioral patterns in pollen foraging, *Arthropod. Plant. Interact.,* 8, 273–283.

7. Eskerrak eta oharrak

Eskerrik beroenak Paula Domínguez Lapido eta Jon Poza landa teknikariei, ikerketa honek eskatzen duen landa lan guztia egingarri eta dibertigarri egiteagatik, mendiko ordu eta egun luzeak arin egiteagatik. Eskerrak nola ez, bide honetan nire tutore diren Ainhoa Magrach eta Arantza Aldezabal ikerlariei eta lan honetan bilduriko polinizatzaileen identifikazioa burutu duen Curro Molinari. Azkenik, lan hau Gorbeiako Parkean egiteko baimena eman digun Bizkaiko Diputazioari ere, eskerrik asko.

Euskal estuarioetako sedimentuetako mikroorganismo harizpidunen aniztasuna: Genomen analisia ikuspuntu bioteknologikotik

Ainara Otamendi[1], Ziortza Agirrezabala[1], Carla Pérez-Cruz[2], Raquel Liébana[2], Iñaki Berregi[1], Anders Lanzén[3,4], Laura Alonso-Sáez[2], Maria Teresa Dueñas[1], Oier Etxebeste[1]

[1]Biologia laborategia, Kimika Aplikatua saila, Kimika Fakultatea, Euskal Herriko Unibertsitatea (EHU/UPV), Donostia.

[2]AZTI, Itsas ikerketa, Basque Research and Technology Alliance (BRTA), Sukarrieta.

[3]AZTI, Itsas ikerketa, Basque Research and Technology Alliance (BRTA), Pasaia.

[4]IKERBASQUE, Ikerketarako euskal fundazioa, Bilbo.

ziortza.agirrezabala@ehu.eus

Laburpena

Itsas inguruneetan mikroorganismo-aniztasun handia dago. Mikroorganismo horien genomek estres-baldintzetara egokitzea ahalbidetzen diete, hala nola gatz-kontzentrazio handiak eta elikagai-eskasia, zein polimero konplexuak degradatzea. Ezaugarri horiei esker, itsas mikroorganismoak tresna bioteknologiko berriak garatzeko iturri baliotsua dira. Lan honetan, euskal kostaldeko estuarioetako sedimentuetatik mikrobio harizpidunak isolatu eta fenotipikoki karakterizatu dira, polisakarido konplexuak degradatzeko edo/eta ingurunera pigmentuak jariatzeko gaitasunean oinarrituta. Hala, intereseko hiru espezieren genomak lehen aldiz sekuentziatu dira, eta haien CAZyme-en zein metabolito sekundarioen gene-multzoen azterketak iradokitzen du jarduera entzimatiko berrien eta metabolito sekundarioen iturri gisa erabil daitezkeela.

Gako-hitzak: Itsas onddo, itsas bakterio, *Sordariomycetes*, *Hypocreales*, CAZymes, *Streptomyces*, metabolito sekundarioen gene-multzo, fukoidan.

Abstract

Marine environments are rich in microbial diversity. Marine microbes have developed genomic resources to adapt to stress conditions, such as high salt concentrations and nutrient scarcity, or to degrade complex polymeric substrates. These features make marine microbes a very valuable resource in the field of biotechnology. In this study, filamentous microbes from sediments of Basque estuaries where isolated and phenotypically characterized based on the capacity to degrade complex polysaccharides or/and secrete pigments to the culture medium. Thus, in this study the genomes of three isolates of interest are reported for the first time and their CAZymes well as secondary metabolite gene cluster analyses suggest that they could be used as a source of novel enzymatic activities and secondary metabolites.

Keywords: Marine fungi, marine bacteria, Sordariomycetes, Hypocreales, CAZymes, Streptomyces, secondary metabolite gene clusters, fucoidan.

1. Sarrera eta motibazioa: itsas mikrobiota eta haren garrantzia.

Ur-inguruneek Lur planetaren azaleraren %70 baino gehiago hartzen dute, eta gehiengo handiena itsasoak (Sandrin et al., 2009). Itsasoko bizidunek, mikrobio-komunitateek (bakterioak, arkeak, protistak, onddoak eta birusak) bereziki, paper garrantzitsua betetzen dute biologikoki ezinbestekoak diren elementuen (karbonoa, nitrogenoa, fosforoa, sufrea eta burdina) zikloetan eta fluxu biogeokimiko osoaren erdia prozesatzen dute, gutxi gorabehera (Fuhrman et al., 2015).

Ozeanoak ingurune heterogeneoak dira eta une oro mugimenduan dauden inguruneak direla kontsideratzen da. Horrek aldaketak eragiten ditu itsas ingurune ezberdinetako mikrobiotan, hainbat faktoreren ondorioz, hala nola, tenperatura, gatz-kontzentrazioa, argia, baldintza meteorologikoak eta

abar. Hori dela eta, askotan muturrekoak diren baldintzetara egokitu dira itsas mikroorganismoak; baldintza horietan bizirauteko ezinbestekoak dituzten gene eta mekanismoak garatu dituzte (Sandrin et al., 2009). Horrenbestez, itsas mikroorganismoak oro har, onuragarriak eta interesgarriak izan daitezke elikagaien industrian, industria farmazeutikoan, bioteknologian zein biomedikuntzan aplikatzeko. Hala eta guztiz ere, gaur egun itsas baliabideak, neurri handi batean, garatu gabe eta gutxietsita daude oraindik ahalmen bioteknologikoaren aldetik (Rotter et al., 2021).

2. Arloko egoera eta ikerketaren helburuak

Gaur egungo gizarteak eta bizimoduak berrikuntza-eskaria handitu du, besteak beste, ongizatean, osasunean, bioteknologian, biomedikuntzan zein elikaduraren arloan. Gizartearen behar horri erantzuna emateko, orain arte gutxi aztertutako eta baliabide bioteknologiko berrien iturri oparoa diren itsas inguruneak aztertzeko premia sortu da (Rotter et al., 2021). 1930eko hamarkadaz geroztik elikagai gehigarri eta osagai kosmetiko gisa asko erabiltzen dira itsas algetatik erauzitako karragenanoa edo beste polisakarido batzuk. Baina, itsas bioteknologia modernoa 1970eko hamarkadaren ondoren zabaldu zen, itsas organismoei eta haien metabolito sekundarioei buruzko ikerketa areagotuz (Rotter et al., 2021).

Aipatu bezala, itsas inguruneak askotarikoak dira mikrobiotari dagokionez eta hori funtsezkoa da itsas ekosistemen funtzio eta osasunerako (Rotter et al., 2021). Orain arte egin diren ikerketa gehienak bakterioen inguruan zentratu dira, eta onddoen erreinua ia guztiz baztertuta geratu da. Hala ere, aztertuak izan diren itsas ingurune guztietan aurkitu izan da onddoen presentzia. Horietako asko itsas zein ingurune lehorretan aurkitzeak agerian uzten du onddoek ingurune ezberdinetara egokitzeko duten gaitasuna. Azpimarratu beharra dago, ordea, gaur arte itsas inguruneetatik isola litezkeen onddoen %10 bakarrik isolatu dela kalkulatzen dela. Horren arrazoietako batzuk dira itsasoko baldintza konplexuak, onddo-espezie askoren hazkuntza motela, eta espezie horietako askok laborategiko baldintzetan hazteko zailtasuna edukitzea (Amend et al., 2019).

Aipatutako gaitasun horiek organismo hauen genoman kodetuta daude eta horien azterketak intereseko geneak identifikatzea eta bioteknologian aplikagarriak izan daitezkeen molekulak ezagutzea ahalbidetzen du. Horien artean daude, esaterako, itsas polisakaridoen degradazioan parte hartzen duten entzimak (glikosil hidrolasa deritzenak), zeinak biomedikuntzan, industria farmazeutikoan zein elikagaien industrian hainbat aplikazio izan ditzaketen. Antigorputzen ingeniaritzan eta tratamendu pertsonalizatuak garatzeko erabil daitezkeela aurreikusten da besteak beste (Hehemann et al., 2012).

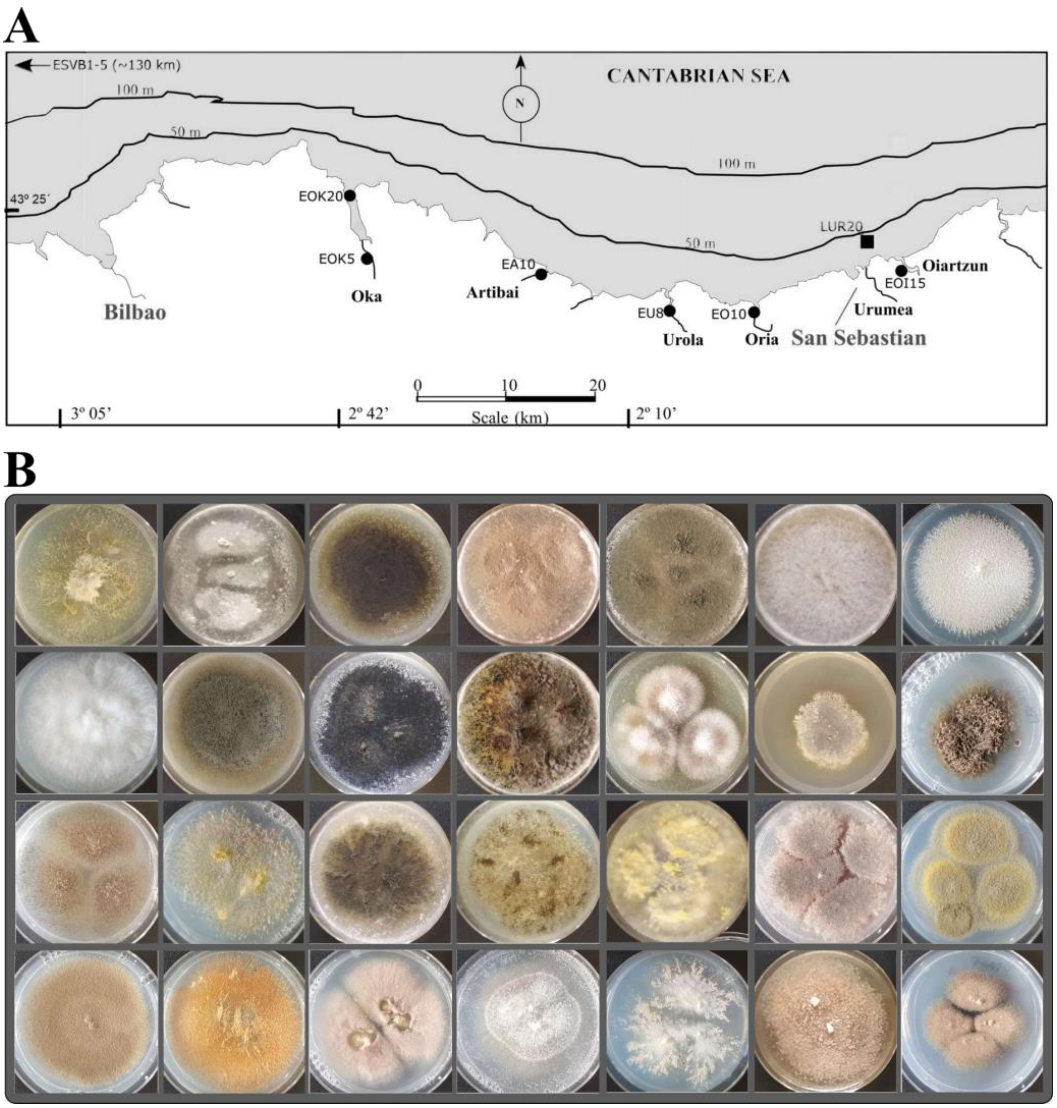
Mikroorganismo horien metabolito sekundarioak ere interesekoak izan daitezke. Mota askotarikoak izan daitezke eta batzuk onuragarriak diren moduan (pigmentuak eta antibiotikoak adibidez), beste batzuk kaltegarriak izan daitezke bai gizakiontzat baita animalia zein landareentzat ere (toxinak esaterako) (Avalos & Limón, 2022). Lan honetan pigmentuen jarioa hartu da aintzakotzat. Izan ere, koloratzaile naturalen eskaera egunetik egunera handitzen ari da, tindu sintetiko batzuen ondorio kaltegarriak direla eta. Bakterio eta onddoetatik eratorritako pigmentuak jatorri naturaleko pigmentuen iturri alternatiboa dira eta beste pigmentu natural batzuekin alderatuta, prozesatzen errazak izatearen abantaila erakusten dute besteak beste. Propietate koloratzaileez gain, bakterio eta onddoetatik eratorritako pigmentuek aktibitate antioxidatzailea, antimikrobianoa eta minbiziaren aurkako aktibitatea ere izan ditzaketela deskribatuta dago literaturan (Narsing Rao et al., 2017).

Aurreko guztia aintzat hartuta, lan honetan, Euskal Herriko hainbat estuariotan jasotako sedimentuetatik mikroorganismo harizpidunak isolatu dira; onddoak nagusiki. Helburuetako bat izan da isolatutako organismoak identifikatzea, euskal kostaldeko bioaniztasunaren mapa bat sortzeko. Horrez gain, isolatutako andui-bildumatik, bioteknologiarako interesekoak izan daitezkeen anduiak identifikatu dira, mediora pigmentuak jariatzeko gaitasunagatik edota itsas iturriko polisakarido sulfatatuak degradatzeko gaitasunagatik. Hautagaien genomen sekuentziazioa eta CAZyme-en (*Carbohydrate Active Enzyme*) zein metabolito sekundarioen gene multzoen analisia ere egin da, jarduera entzimatiko berrien eta metabolito sekundario berrien identifikaziorako bidean.

3. Ikerketaren muina

Esan bezala, lan honetan euskal kostaldeko hainbat estuariotako sedimentuen laginak bildu ziren bertako mikroorganismo harizpidunak isolatu eta identifikatzeko. Lehen irudian adierazten den moduan, laginak zortzi puntu ezberdinetan bildu ziren: Bizkaiko Oka (EOK5 eta EOK20) eta Artibai (EA10) ibaietan, Gipuzkoako Urola (EU8), Oiartzun (EOI15) eta Oria (EO10) ibaietan eta Urumea ibaiaren itsas eremuan (LUR20). Jasotako sedimentu-laginetatik 294 andui isolatu ziren MEA (*malta-estraktu agarra*), PDA (*patata dextrosa agarra*), CMA (*arto irinezko agarra*), Lc eta Pc, aurrez definitutako kultura medioetan, hala nola, gure laborategian prestatutako fukoidan polisakaridodun medio minimoan (MMM).

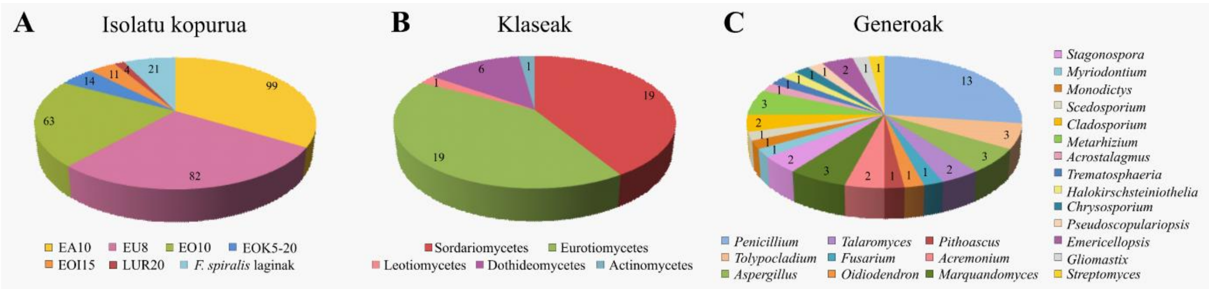
1. irudia. A. Laginketa egin zen euskal kostako zortzi puntuak. Puntuek estuarioak adierazten dituzte; laukiak itsas eremua. B. Isolatutako andui batzuen fenotipoak MEA medioan.



3.1. Euskal kostaldeko mikrobiota harizpidunaren bildumaren karakterizazioa

Lanaren lehen helburua lortzeko, hau da, Euskal Herriko estuarioetan aurki daitezkeen mikroorganismoak identifikatzeko, lehenik, haien DNA laginak erauzi ziren. Ondoren, PCR teknika erabili zen genero (eta kasu batzuetan espezie) bakoitzarentzat identifikagarriak diren ITS izeneko eremuak anplifikatzeko. Gerora, Sanger sekuentziazio bidez sekuentziatu ziren ITS eremuok Madrilgo Secugen enpresan. Sekuentzia horiek NCBI datu-baseko sekuentziekin konparatu ziren Blast eginez. Gure bildumako 294 anduietatik 47-ren generoa identifikatu zen (bildumaren %16; andui gehiagoren identifikazioarekin lanean dihardugu).

2. irudia. Euskal kostaldeko harizpi-itxurako mikroorganismoen aniztasuna. *A*. Leku edo erabilitako prozedura bakoitzarekin isolatutako andui kopurua. *B. C.* ITS eremuen sekuentziazio bidez identifikatutako anduiei dagozkien klase eta generoak.

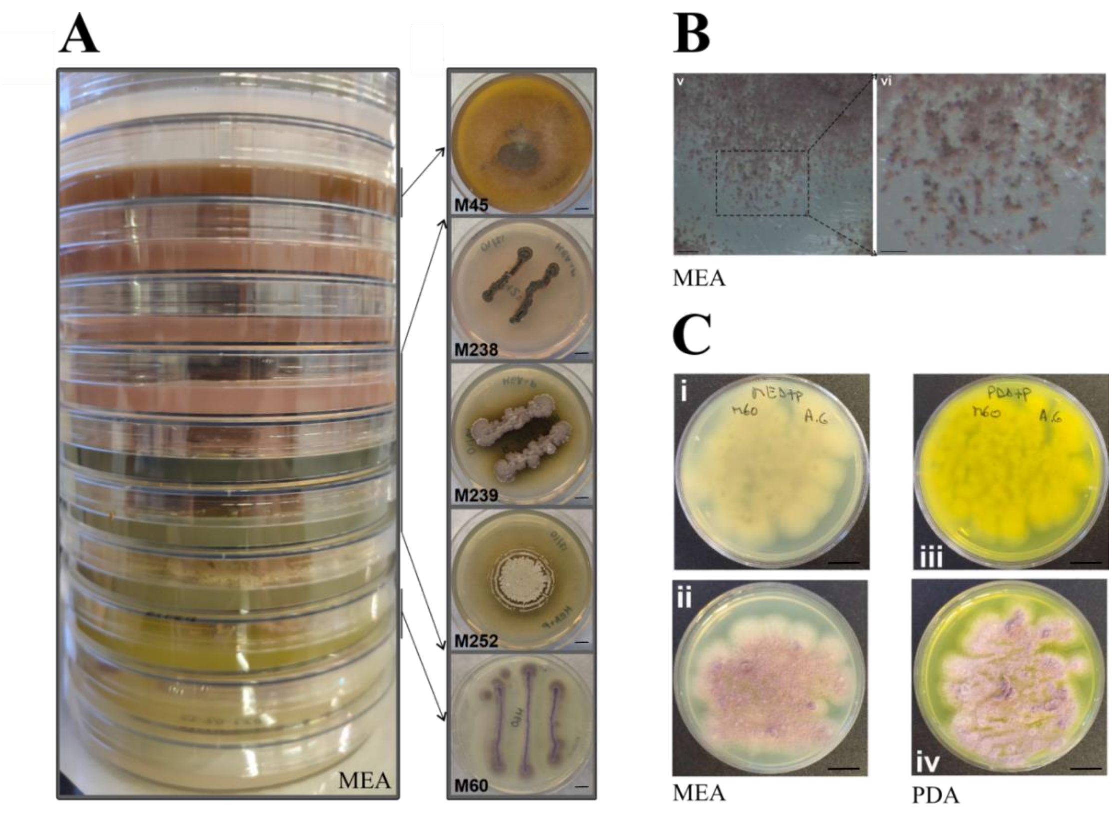


Horrela, 2. irudian adierazten den moduan, euskal kostaldeko mikrobiota kultibagarria (laborategiko baldintzetan haz daitekeena) Eurotiomycetes (gehiengoa *Penillicilium* generokoak) eta Sordariomycetes (*Marquandomyces, Tolypocladium,* eta *Metarhizium* generokoak nagusiki) klaseek osatzen dutela ikusi zen, mikroorganismo harizpidunei dagokienez. Neurri txikiagoan, Dothideomycetes eta Leotiomycetes onddo klaseetako espezieak ere identifikatu diren. Horiez gain, bakterio espezie bat ere identifikatu zen, Actinomycetes klasekoa (*Streptomyces* generoa).

3.2. Pigmentuak jariatzeko gaitasuna

Isolatutako anduien artean, esan bezala, batzuk pigmentuen ekoizle izateko hautagaitzat identifikatu ziren. Kasu honetan, eta 3. irudian argi ikus daitekeen moduan, hautagaitzat hartu ziren hazkuntza-medioaren kolore-aldaketa eragiten zutenak.

3. irudia. A. Pigmentuak jariatzen dituzten andui batzuen irudiak. Petri plaken diametroa: 9 cm. Eskala-barrak: 1 cm. B. M60 anduiaren garapen-egiturak. Eskala-barrak: 0,1 (v) eta 0,01 cm (vi). C. M60 anduiaren kolonia moreak eta medioari ematen dion kolore horia erakusten dituzten irudiak, MEA eta PDA medioetan. Plaken diametroa: 5.5 cm. Eskala-barrak: 1 cm.



Pigmentuak jariatzen dituzten anduietatik M60 anduia hartu zen hautagai nagusitzat, kolore moreko fenotipoaren (ikusi 3C panela) eta hazkuntza-medioari ematen dion kolore hori esanguratsuan

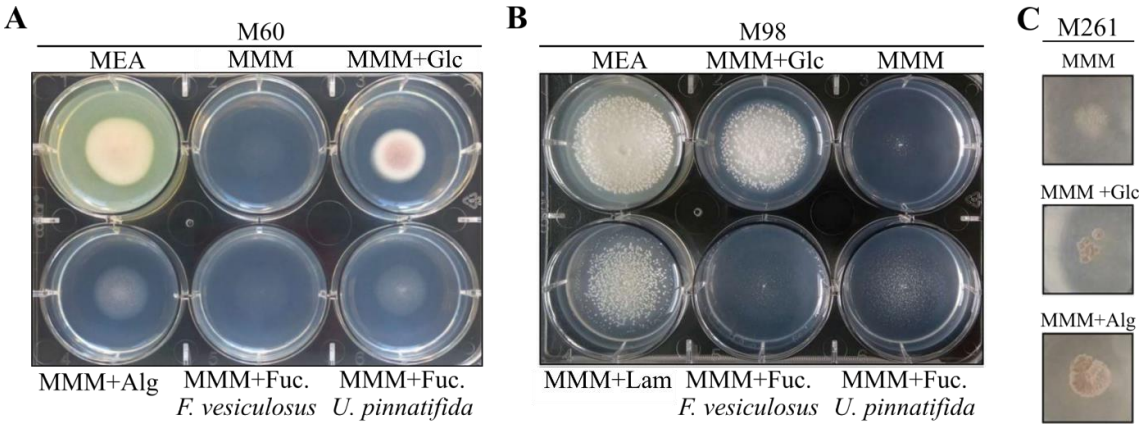
oinarrituta. Ikus daitekeen moduan, hazkuntza-medioak kolore horia hartzen du bai MEA (*malta-estraktu agarra*) eta bai PDA (*patata dextrosa agarra*) medioan ere, bigarren horren kasuan nabarmenagoa izanik.

3.3. Polisakaridoak degradatzeko gaitasuna

Isolatutako anduien azterketa fenotipikoaz gain, polisakaridoak degradatzeko duten gaitasuna ere aztertu zen. Horretarako, mikroorganismo hauek karbono-iturri ezberdinez hornitutako kultura-medioetan hazi ziren: glukosa, laminarina, alginatoa edo fukoidana (azken kasu horretan, *Fucus vesiculosus* edo *Undaria pinnatifida* algetatik eratorritako bi produktu komertzial ezberdin). Laminarina, alginatoa eta fukoidana itsas jatorria duten egitura anitzeko polisakaridoak dira; algetatik erauziak hain zuzen.

Horrela, gure bildumako anduiak polisakarido ezberdinak degradatu eta haietatik karbonoa elikagaitzat eskuratzeko gai ote ziren behatu zen. Kasu honetan, M60, M98 eta M261 anduiak hartu ziren hautagaitzat. Laugarren irudiaren A (M60 anduiari dagokiona), B (M98 anduiari dagokiona) eta C (M261 anduiari dagokiona) paneletan ikus daitekeenez, M98 anduiak laminarina eta fukoidan-dun medioetan, eta M261 anduiak alginatoz hornitutako medioan, MMM kontrol negatiboan baino hazkuntza erradial hobea erakutsi zuten. M60-aren kasuan ere (4B panela), nahiz eta hain nabarmena ez izan, ikus daiteke alginato zein *U. pinnatifida*-tik eratorritako fukoidan-dun medioetan kontrol negatiboan baino hazkuntza erradial hobea lotzen dela. Hortaz, ondoriozta daiteke ezen hiru mikroorganismo hauek gai liratekeela polisakarido horien kateak moztu eta karbono-iturri moduan erabiltzeko, bioteknologiarako interesgarri izan daitezkeen aktibitate entzimatikoak kodetu ditzaketela iradokiz.

4. irudia. M60 (A), M98 (B) eta M261 (C) anduien fenotipoa karbono-iturri ezberdinez hornitutako kultura-medioetan. Glc: glukosa, Lam: laminarina, Fuc: fukoidan, Alg: alginato.

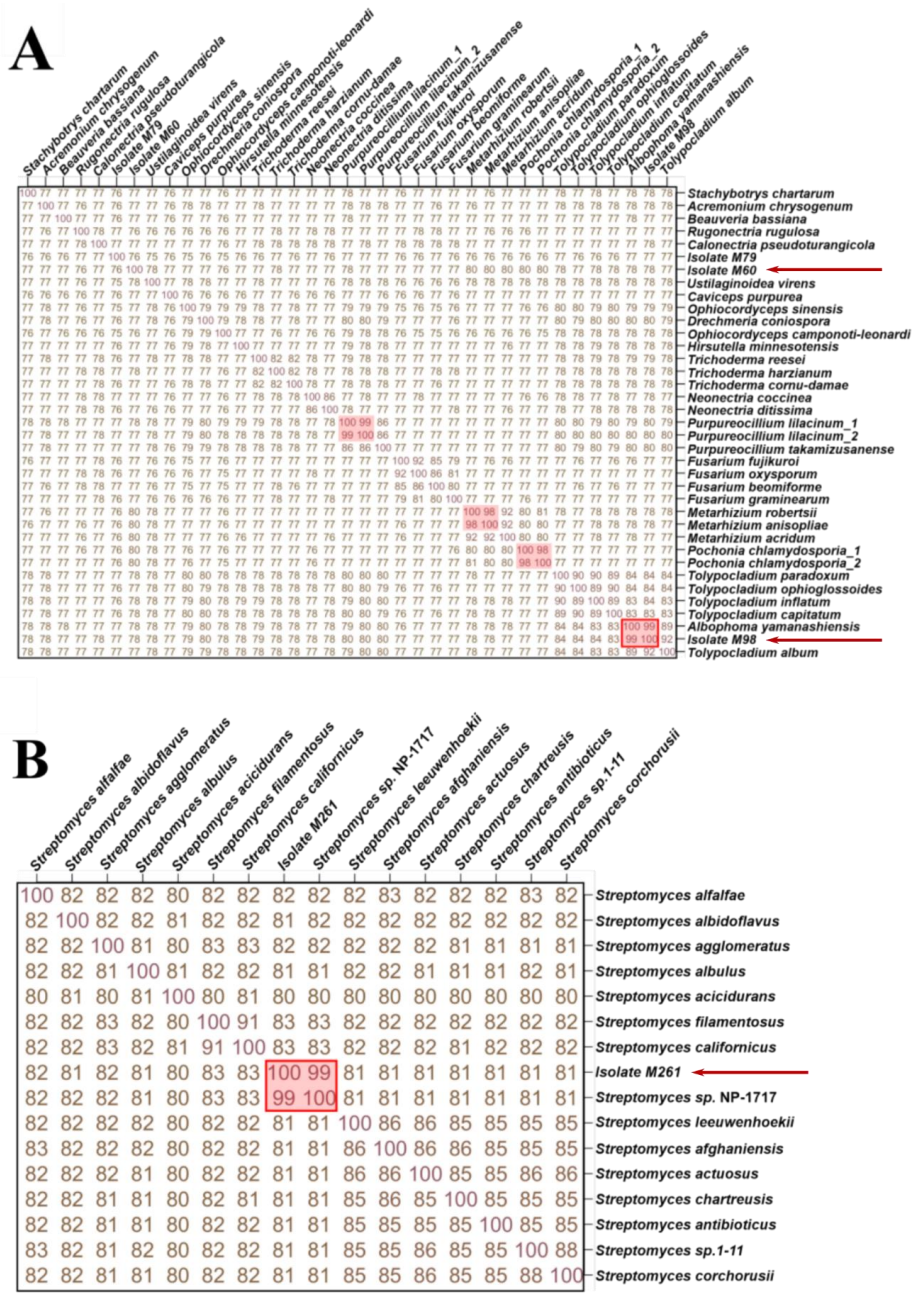


3.4. M60, M98 eta M261 intereseko anduiei dagozkien espezieen determinazioa

Orain arte azaldu denez, sortutako bildumatik hiru andui aukeratu ziren eduki lezaketen ahalmen bioteknologikoarengatik: M60, M98 eta M261. Haien DNA laginak erauzi eta andui bakoitza zein espezieri zegokion aurresateko ITS eremuen anplifikazioa eta sekuentziazioa egin ondoren (ikusi 3.1. atala), DNA genomikoa; hau da, DNA osoa, sekuentziatu zen Illumina plataforman. DNA genomikoa sekuentziatuta, alde batetik, ANI (*Average Nucleotide Identity*) analisia egin zen ITS sekuentziekin aurresandako espezieak baieztatzeko (ikusi 5. irudia) eta, bestetik, DNA genomikoaren analisia egin zen CAZyme-ak edo metabolito sekundarioen sintesirako beharrezkoak diren proteinak kodetzen dituzten geneen edo gene-multzoen azterketarako (ikusi 6. irudia).

M98 anduiarentzat ANI analisiak baliorik handiena *Albophoma yamanashiensis* espeziearekin eman zuen (5A panela). M261 anduiari dagokionez, berriz, *Streptomyces* generoko bakterio bat dela ikusi zen (5B panela; *Streptomycessp.*NP-1717). M60 anduiaren kasuan, ANI analisiak *Metarhizium* eta *Pochonia* generoetatik gertu kokatu zuen (% 80ko balioarekin, 5A panela). Datu horrekin, ITS sekuentziazioen emaitzekin eta aurretik bibliografian deskribatuta dagoen fenotipo bereizgarria (Mongkolsamrit et al., 2020) kontuan hartuta, M60 anduia *Marquandomyces marquandii* espeziekoa dela ondorioztatu zen.

5. irudia. M60 (A), M98 (A) eta M261 (B) anduien genomaren ANI analisiak.

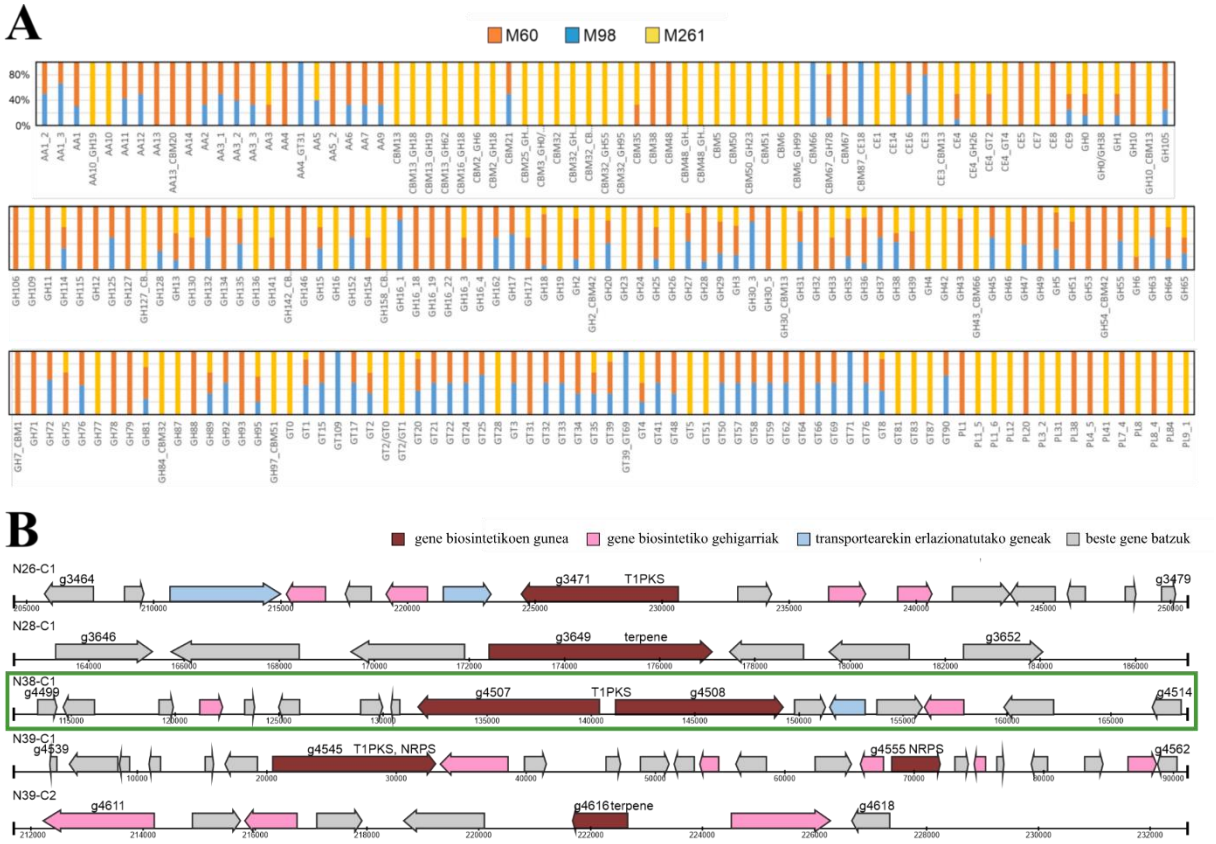


3.5. M60, M98 eta M261 anduien genomek ustez kodetutako CAZyme-en eta M60-aren metabolito sekundarioen gene-multzoen azterketa

Lehen atalean aipatu da itsas mikroorganismoek ingurune berrietara egokitzeko garatu dituzten mekanismoek interes bioteknologikoa izan dezaketela. Horrenbestez, M60 anduiak hazkuntza-medioa kolore horiz tindatzen duela ikusirik eta bai M60, M98 bai M261 anduiek itsas polisakarido espezifikoak degradatzeko erakutsitako gaitasunari jarraikiz, hiru hautagaien genomen azterketari ekin zitzaion.

Alde batetik, hiru anduien CAZyme-ak aztertu ziren polisakaridoak degradatzeko aktibitate entzimatiko posibleak identifikatzeko asmoz. Azterketa dbCan2 datu-basearen bitartez egin zen, eta 6. irudiko A panelean ikus daitezke M60 (laranjaz), M98 (urdinez) eta M261 (horiz) anduien genomek ustez kodetzen dituzten CAZyme-en laburpena. Analisi hauen arabera, hiru anduiek hainbat glikosil hidrolasa (lotura glikosidikoen hidrolisia katalizatzen duten entzimak) kodetzen dituzte, tartean bakterioetan alginatoa zein fukoidana degradatzeko beharrezkoak diren familietakoak. Horrenbestez, polisakaridoak degradatzeko gaitasuna azalduta geratuko litzateke.

6. Irudia. A. M60 (laranjaz), M98 (urdinez) eta M261 (horiz) anduien genomek ustez kodetutako CAZyme-en analisiaren emaitzak. B. M60 anduiaren metabolito sekundarioen gene-multzo batzuk. Berdez: urea sorbizilina ekoizteko gene-multzoa. Konposatu hau M60 koloniek jariatzen dute hazkuntza medioa horiz tindatuz.



M60 anduiaren kasuan, polisakaridoak degradatzeko izan lezakeen gaitasunaz haratago, haren hautagaitzaren arrazoi nagusia hazkuntza-medioari ematen dion kolore horia izan zenez, metabolito sekundarioei dagozkien gene-multzoen identifikaziorako azterketa egin zen antiSMASH algoritmoaren bidez. Horri esker, pigmentu horia (urea sorbizilina) kodetzen duen gene-multzoa identifikatu zen (6B panelean berdez markatuta).

4. Ondorioak

- Euskal estuarioetako onddo harizpidun kultibagarriak Sordariomycetes eta Eurotiomycetes klaseei dagozkie, batik bat.
- Mikroorganismo harizpidun horien artean badira bioteknologiaren arloan interesekoak izan daitezkeenak.
- *Marquandomyces marquandii* eta *Albophoma yamanashiensis* espezieek polisakaridoen degradazioan eta pigmentuen jarioan potentzialki parte hartzen duten CAZyme-ak eta aktibitate entzimatikoak kodetzen dituzte. Espezie horien genomaz egiten den lehen deskribapena da lan honetan jasotakoa.

5. Etorkizunerako planteatzen den norabidea

Etorkizunean, isolatutako anduien artean identifikatu gabe dauden horien genero zein espezieak determinatzen jarraitzea aurreikusten da. M60, M98 eta M261 anduien polisakaridoak degradatzeko gaitasuna ere sakonago eta kuantitatiboki aztertu nahi da, alde batetik, karbono-iturri ezberdinekin

hornitutako hazkuntza-medioetan sortutako biomasa neurtuko da eta, bestetik, RNA sekuentziazioa egingo da, polisakarido ezberdinak degradatzean zer gene-multzo aktibatzen diren aztertuko delarik. Horrez gain, M60, M98 eta M261 anduien genomaren sekuentziazioa berregingo da, oraingoan Nanopore sekuentziazioaren bidez, bi helburu nagusirekin: bata, genomaren mihiztadura eta gene-multzoen azterketa hobetzea; eta bestea, RNA-seq azterketetan erabili ahal izateko andui bakoitzaren genomari dagozkion erreferentziazko fitxategiak ahalik eta osatuenak izatea. Ondoren, polisakarido horien degradazioan parte hartzen duten entzimak identifikatu, isolatu eta degradazio hori nola gertatzen den ulertzea planteatzen da ondoren aplikazio bioteknologikoak izan ditzaketelakoan.

6. Erreferentziak

Anthony, A., Gaetan, B., Michael, C., P, E. V., L, E. C., Gutiérrez, M. H., Joseph, H., Y, H. E. F., Giuseppe, I., C, J. A., Maiko, K., T, P. K., Alisha, Q. C., Seshagiri, R., Mertixell, R., Jason, S., José, V.-M., K, W. A., Oded, Y., & S, G. A. (2019). Fungi in the Marine Environment: Open Questions and Unsolved Problems. *MBio*, *10*(2), e01189-18. https://doi.org/10.1128/mBio.01189-18

Avalos, J., & Limón, M. C. (2022). Fungal Secondary Metabolism. *Encyclopedia*, 2(1), 1–13. https://doi.org/10.3390/encyclopedia2010001

Fuhrman, J. A., Cram, J. A., & Needham, D. M. (2015). Marine microbial community dynamics and their ecological interpretation. *Nature Reviews Microbiology*, *13*(3), 133–146. https://doi.org/10.1038/nrmicro3417

Hehemann, J.-H., Kelly, A. G., Pudlo, N. A., Martens, E. C., & Boraston, A. B. (2012). Bacteria of the human gut microbiome catabolize red seaweed glycans with carbohydrate-active enzyme updates from extrinsic microbes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *109*(48), 19786–19791. https://doi.org/10.1073/pnas.1211002109

Mongkolsamrit, S., Khonsanit, A., Thanakitpipattana, D., Tasanathai, K., Noisripoom, W., Lamlertthon, S., Himaman, W., Houbraken, J., Samson, R. A., & Luangsa-Ard, J. (2020). Revisiting *Metarhizium* and the description of new species from Thailand. *Studies in mycology*, *95*, 171–251. https://doi.org/10.1016/j.simyco.2020.04.001

Narsing Rao, M. P., Xiao, M., & Li, W.-J. (2017). Fungal and Bacterial Pigments: Secondary Metabolites with Wide Applications. *Frontiers in Microbiology*, *8*. https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01113

Rotter, A., Barbier, M., Bertoni, F., Bones, A. M., Cancela, M. L., Carlsson, J., Carvalho, M. F., Cegłowska, M., Chirivella-Martorell, J., Conk Dalay, M., Cueto, M., Dailianis, T., Deniz, I., Díaz-Marrero, A. R., Drakulovic, D., Dubnika, A., Edwards, C., Einarsson, H., Erdoğan, A., … Vasquez, M. I. (2021). The Essentials of Marine Biotechnology. *Frontiers in Marine Science*, *8*. https://doi.org/10.3389/fmars.2021.629629

Sandrin, T. R., Dowd, S. E., Herman, D. C., & Maier, R. M. (2009). Chapter 6 - Aquatic Environments. In R. M. Maier, I. L. Pepper, & C. P. Gerba (Eds.), *Environmental Microbiology (Second Edition)* (pp. 103–122). Academic Press. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-370519-8.00006-7

7. Eskerrak eta oharrak

Lan hau Eusko Jaurlaritzaren finantzaketarekin (KK-2021/0034, KK-2022/00107, IT1662-22 eta PIBA_2020_1_0032_GVB0 proiektuen bidez) eta UPV/EHU-ren finantzaketarekin (GIU19/04 proiektua) burutu da. A.O. Margarita Salas deialdiko laguntzarekin aritu zen. Z.A.-k KK-2022/00107 proiektuak finantzatutako doktoratu aurreko kontratua du. Lan hau Elkartek deialdiko EMOTION akronimodun KK-2022/00107 proiektuaren baitan gauzatzen ari da.

Hegaztien dibertsitatea Bizkaiko baso natural eta landaketa exotikoetan

Unai Sertutxa, Lorena Peña, Ibone Ametzaga, Unai Ortega
Euskal Herriko Unibertsitatea (UPV/EHU), Landareen Biologia eta Ekologia saila.
unai.sertutxa@ehu.eus

Laburpena

Eukalipto landaketen azalera hazi egin da Euskal Herrian azken hamarkadetan. Galizian eta Portugalen egindako ikerketek erakutsi dute eukalipto landaketek hegaztien dibertsitate baxua dutela. Euskal Herrian, ordea, oso informazio gutxi dago gaiaren inguruan. Ikerketa honetan, hegaztien identifikazio eta kontaketa bidez, Bizkaiko hiru baso sistema garrantzitsuenak konparatu dira: baso naturalak (baso mixto atlantikoak eta haritz kandudunez osatutako hariztiak), eukalipto landaketak eta pinu landaketak. Gainera, hegaztietan eraginak dituzten basoen ezaugarriak identifikatu dira. Gure emaitzen arabera, hegazti dibertsitatea altuagoa da basoetan landaketetan baino eta zuhaitzen dentsitateak eta altuerak, eta landare aberastasunak hegaztien dibertsitatean eragina dute.

Hitz gakoak: biodibertsitate, eukalipto, pinu, espezie autoktono, baso egitura

Abstract

The area of eucalyptus plantations is increasing in the Basque Country the last decades. In Galicia and Portugal researches have shown that avian diversity is lower in those plantations. However, there is lack of information on the subject in the Basque Country. In our study, we compare the most important forest systems of Biscay: natural forests, eucalyptus plantations and pine plantations. Besides, we identified forest characteristics that affect birds. Our results show that avian diversity is higher in natural forests than in plantations and that tree density and height, and plant richness are important factors to explain bird diversity in forest systems.

Keywords: biodiversity, eucalyptus, pine, native species, forest structure

1. Sarrera eta motibazioa

Baso landaketen azalera handitzen doa mundu mailan (Wang et al., 2021a) eta baso naturalen eta haien biodibertsitatearen kontserbaziorako arazo handienetako bat da gaur egun (Wang et al., 2021b). Lur erabileraren aldaketa horrek gizakioi eragiten digu, baso naturalek, landaketek baino ekosistemen zerbitzu gehiago eskaintzen dizkigutelako (Onaindia et al., 2018). Europa mailan, aldaketa horiek pairatu dituen zonaldeetako bat da Iberiar Penintsulako iparraldea, non zuhaitz formazioen gehiengoa baso landaketak diren, batez ere pinu eta eukaliptoak (De la Hera et al., 2013). Euskal Herrian adibidez, paisaiaren aldaketa handia izan da, garaiko eta lekuko beharrizanen arabera. XVI. mendetik aurrera, eremuan eman den deforestazioa hazi egin zen batez ere ontzigintza eta industriarengatik (Aragón, 1988; Garayo, 1993). XIX. mendean, deforestazioaren inguruko kezka asko handitu zen Euskal Herrian eta basoak berreskuratzeko asmoz zuhaitzak landatzen hasi ziren, espezie autoktono eta exotikoak erabiliaz. Pinuen moduko espezie batzuen hazkuntza azkarrak probetxua ateratzeko aukera zabaldu zuen eta horien landaketak asko hazi ziren XIX eta XX. mendeetan, batez ere *Pinus radiata* D. Don espeziearenak (Michel, 2006). Hori dela eta, pinu landaketak dira gaur egungo paisaiaren ezaugarri nabarmenena.

Euskal Herrian, pinu landaketen eragin ekologikoak aztertuak izan dira. Esaterako, lurzoruan (Edeso et al., 1998) eta biodibertsitatean (Amezaga eta Onaindia, 1997) efektu kaltegarriak izan ditzaketela ikusi da. Pinuen azikulen deskonposaketa geldoak materia organikoa metatzea eragiten du eta elikagaien zikloa ez ixtea eragin dezake horrek (Barraqueta eta Basagoiti, 1988). Ondorioz, lurzoruko elikagaien gutxitzea eragin dezakete (Amezaga et al., 1997). Paisaian eta ingurumenean (lurzoruaren propietateen alterazioa edo lurraren higadura esaterako) dituzten inpaktuengatik, baso landaketen kudeaketa iraunkorra ez dela esan daiteke (Ainz, 2008). Hala ere, beste ikerketa batzuek defendatzen dute baso naturalen eta pinu landaketen biodibertsitateen arteko desberdintasunak ez direla hain handiak (Martin de Agar et al., 1992) eta sarritan pinu

landaketak aukera ona direla baso natural autoktonoen berreskurapena bultzatzeko (Onaindia et al., 2013), landaketa horien oihanpean hazten diren landareak baso naturaletako espezieak direlako (Brockerhoff et al., 2003).

Eucalyptus generoko espezieak asko erabili dira azken urteetan Euskal Herriko landaketetan, daukaten errentagarritasunagatik. Zuhaitz horiek hazkuntza oso azkarra dute (Veiras eta Soto, 2011), pinuena baino azkarragoa, eta egur aproposa lortzen da batez ere papera egiteko (García, 2015). Hori dela eta, eukalipto landaketen azalera asko hazi da Euskal Autonomia Erkidegoan azken hamarkadetan (10.405 hektareatik 1996an, 24.771 hektareara 2021ean).

Eukalipto landaketen eragin ekologikoak ere aztertuak izan dira munduan zehar. Kasu askotan, eragin kaltegarriak dituztela frogatu da. Hegaztien, landareen eta makroornogabeen dibertsitate eta ugaritasunak eukalipto landaketetan baso naturaletan baino baxuagoak direla egiaztatu da adibidez (Larrañaga et al., 2009; Bas et al., 2018; Goded et al., 2019). Gainera, baso helduak behar dituzten espezieentzako oso desegokiak direla jakina da (Ashman et al., 2020), mozketa txanda oso laburrak (12-15 urte) dituzten zuhaitzak direlako (Veiras eta Soto, 2011).

2. Arloko egoera eta ikerketaren helburuak (Azpiatalak eta zerrendak)

Bizkaian, 2022an, lege-luzamendu bat jarri zen martxan, eukaliptoen landaketa debekatzen duena 2026 arte. Tarte horretan, eukaliptoen eraginak aztertu eta horiek eremuan nola joka dezaketen aztertzea ezinbestekoa da. Iberiar Penintsulako beste leku batzuetan, hots, Portugalen eta Galizian, ikerketa asko eraman dira aurrera, baina Euskal Herrian gutxiago dira landaketa horien inguruan eginiko ikerketak (Elosegi et al., 2020). Beraz, informazio eta datu gehiago eskaintzea ezinbestekoa da kudeaketa egoki bat diseinatu ahal izateko.

Gorago aipatu denez, pinu landaketak dira paisaiaren ezaugarri nagusia. Azken urteetan, pinuen gaixotasunek eraginda, eukaliptoengatik ordezkatuak izan dira hektarea asko. Horregatik, bien arteko konparaketa egitea interesgarria izan daiteke, ematen ari diren aldaketen ondorioak hobeto ulertzeko. Izan ere, ikerketa gutxik hartzen dituzte kontuan landaketa ezberdinen artean dauden aldeak (Calviño-Cancela, 2013). Horrez gain, eremuko landaretza potentziala ere kontutan hartzea interesgarria izan daiteke, habitat naturalekin konparaketa egin ahal izateko. Kasu honetan, baso mixto atlantikoak eta hariztiak dira landaretza potentziala (Loidi et al., 2011).

Bizkaiko hiru baso sistema garrantzitsuenen (baso naturalak, eukalipto landaketak eta pinu landaketak) hegazti dibertsitateen artean dauden ezberdintasunak ezagutzea eta baso barruan hegazti espezieen dibertsitatean eta ugaritasunean eragiten duten faktore garrantzitsuenak identifikatzea dira ikerketaren helburuak. Gaiarekin lotutako bibliografia jarraituz, gure hipotesien arabera, basoetan landaketetan baino dibertsitate eta ugaritasun altuagoak aurkituko dira eta basoaren egiturarekin loturiko aldagaiak izango dira horietan eragingo duten faktore garrantzitsuenak.

3. Ikerketaren muina

3.1 Metodologia

Ikerketa Bizkaia probintzian egin zen. Bizkaiak 2.217 km^2-ko azalera du eta %59,5a zuhaitz formazioz osaturik dago (HAZI, 2022). Zuhaitz formazioen %49,8a pinuz estalita dago, arruntena *Pinus radiata* izanik, pinuen %87,2a betetzen duena. Eukalipto landaketek %16,5a estaltzen dute, *Eucalyptus globulus* (eukaliptoen %50,8) eta *Eucalyptus nitens* (eukaliptoen %45) espezieak izanik garrantzitsuenak. Azkenik, baso naturalek zuhaitz formazioen %24,1a betetzen dute. Horietatik, %52,2a baso mixto atlantikoak betetzen du eta %9,7a haritz kandudunez osatutako hariztiak (HAZI, 2022), ikerketa honetan erabili direnak.

10 hirukote aukeratu ziren, bakoitza sistema bateko partzela batez osatua: baso autoktonoak (baso edo baso natural moduan ere testuan), *Eucalyptus* generoko espezien landaketak (eukalipto landaketa eta eukaliptadi moduan ere testuan) eta *Pinus radiata* espeziearen landaketak (pinu landaketa edo pinudi moduan ere testuan). Gutxienez 20 hektareako partzelak aukeratu ziren,

bakoitzean bi puntutan lagintzeko eta ertz-efektua ahalik eta gehien murrizteko. Hirukote bereko partzelen arteko tamaina ezberdintasunak ahalik eta gehien murriztu ziren (partzela handienaren eta txikienaren artean 14 ha baino gutxiagoko aldea denetan, 8,95 ± 3,52 bataz beste) eta beraien arteko distantzia txikia zutenak aukeratu ziren (10 km-ko distantzia baino gutxiago beti, 6,05 ± 1,65 km bataz beste). Zeuden aukeretatik zoriz 10 hirukote hautatu ziren.

Partzela bakoitzean bi puntu ezarri ziren laginketetarako, gutxienez partzelaren ertzetik 100 m-ra eta gutxieneko 250 m-ko distantziarekin puntuen artean, elkarren arteko berdintasunak ahalik eta gehien gutxitzeko. Puntu bakoitzean hegaztiak, landareak eta lurzorua lagindu ziren.

Hegaztien laginketak 2021eko bi garai ezberdinetan egin ziren, udaberri amaieran (maiatza-ekaina) eta uda amaieran (abuztu-iraila), garai ezberdinetako datuak edukitzeko. Puntu eta garai bakoitzean 10 minutuko laginketak egin ziren, 25 m-ko erradioko distantzian ikusi eta entzundako hegazti guztiak apuntatuz (Proença et al., 2010). Laginketa guztiak egunsentia eta 11:00ak tartean egin ziren, hegaztientzako desegokiak diren fenomeno meteorologikoak saihestuz, hots, euria edo haizea. Hirukote berdineko 6 puntuak (2 puntu 3 partzelatan) egun berean lagindu ziren eta egun bakoitzean sistema mota lagintzeko ordena aldatu egiten zen, eguneko orduaren efektua ezabatzeko.

Landare baskularren eta lurzoruaren laginketak 2021eko ekaina eta urria artean egin ziren. Lehenengo, partzela bakoitzeko puntu bat lagindu zen eta partzela guztiak lagindu ostean, bigarren puntua lagindu zen denetan. Hirukote bakoitzeko laginketak gehienez bi eguneko tartean egin ziren, garaiaren efektua gutxitzeko.

Puntu bakoitzean 50 m-ko bi trantsektu jarri ziren perpendikularki, gurutze baten forman (Brower eta Zar, 1979). Horietako bat aldaparekiko paraleloan kokatu zen eta bestea perpendikularrean. Trantsektu bakoitzean, 5 laukizuzen formako partzela txiki sortu ziren, 5x2 m-koak (10 m^2), 5 m-ko distantzia utziz batetik bestera eta erdikoa partekatzen zuten (9 laukizuzen guztira, 90 m^2).

Basoaren estruktura trantsektu bertikaleko 15, 30 eta 45 metroetan neurtu zen, *point centered quarter method* (puntu zentro karratu metodoa) erabiliaz (Brower eta Zar, 1979). Zuhaitzen altuera eta diametroa neurtu ziren, eta dentsitatea kalkulatzeko erdiko punturainoko distantzia. 5 laukizuzenetan lurzorua jaso zen pH-a eta materia organiko kantitatea neurtzeko. 25 g lur 50 g ur nahastu eta pH-a neurtu zen. Gainontzeko lurzoru-lagina lehortu eta pisatu ostean, muflan erre zen 24 orduz 400 ºC-tan. Galdutako pisua materia organiko kantitatea zen. Laukizuzen guztietan landare-konposizioa lagindu zen. Ikusitako espezieak identifikatu ziren Aizpuru et al. (2000)-en gakoa jarraituz.

Analisi estatistiko guztiak JAGS (4.3.1 bertsioa) eta Rstudio (2022.12.0 bertsioa) programen bidez egin ziren. Hegazti aberastasuna (HA, puntuan kontatutako espezie kopurua) eta ugaritasuna (HU, puntuan kontatutako indibiduo kopurua) erabili ziren menpeko aldagai gisa. Bi aldagaien normaltasuna eta homozedastizitatea berrikusi ostean, ANOVA proba egin zen aldagai bakoitzarentzat, aldagai aske gisa sistema hartuta. Tukey postHoc proba erabili zen aldeak bakarka aztertzeko.

Eredu bayestar hierarkikoak sortu ziren dibertsitate eta aberastasunean eragiten duten efektu esanguratsuak identifikatzeko. Hierarkia jatorriko ordenatuari aplikatu zitzaion, sistema mota aldagai bezala erabiliaz, hau da, baso sistema bakoitzak balio bat hartzen du jatorriko ordenatuarentzako. Ereduak sortzeko hurrengo aldagaiak erabili ziren: landare aberastasuna (LA, landare espezie kopurua), zuhaitzen dentsitatea (ZD, hektareako zuhaitz kopurua), zuhaitzen altuera (ZA), lurzoruaren pH-a (pH), lurzoruko materia organiko kantitatea (MO), ur masa hurbilenerako distantzia (UR) eta altitudea (ALT).

Aldagai guztiak biltzen zituzten ereduak sortu ziren bi menpeko aldagaiak azaltzeko (hegazti aberastasun eta ugaritasuna):

$$HA = \alpha_{E,B,P} + \beta_{LA}*LA + \beta_{ZD}*ZD + \beta_{ZA}*ZA + \beta_{pH}*pH + \beta_{MO}*MO + \beta_{UR}*UR + \beta_{ALT}*ALT + \varepsilon$$

$$HU = \alpha_{E,B,P} + \beta_{LA}*LA + \beta_{ZD}*ZD + \beta_{ZA}*ZA + \beta_{pH}*pH + \beta_{MO}*MO + \beta_{UR}*UR + \beta_{ALT}*ALT + \varepsilon$$

, non α ordenatuen jatorria den, sistema bakoitzarentzako balio bat duena (E: eukalipto, B: baso eta P: pinu), β_i i aldagaiaren malda parametroa den eta ε ereduaren errorea.

Horietatik abiatuta, eredu sinpleagoak sortu ziren esangura gutxien zuten aldagaiak eta beraien parametroak baztertuaz (parametroari 0 balioa emanaz). Ugaritasunaren kasuan poisson banaketa erabili zen, datuen izaera naturalagatik (kontaketak) eta banaketa horretara hurbiltzen zirelako datuak. Aberastasunaren kasuan, ordea, banaketa normala erabili zen, datuak banaketa honetara hurbiltzen zirelako. Informazio gutxiko 'prior'-ak erabili ziren parametroen ondorengo banaketak lortzeko.

Bakoitzaren "Deviance Information Criterion" (DIC) eta "Posterior predictive loss" (D_∞) kalkulatu eta konparatu ziren eredu aukeraketa egiteko. Ereduen konparaketa eta aukeraketa egiterako orduan, DIC eta D_∞ -ren balioa zenbat eta baxuagoa izan orduan eta hobea izango da eredua beste batzuekin alderatuz. Aukeratutako azken ereduaren sinesgarritasun tarteak (*credible intervals*, CI, %95) kalkulatu ziren aldagai esanguratsuak identifikatzeko (aldagaien β parametroa hartzen da kontuan, 0 balioa lorturiko tarteen artean ez badago, eragin esanguratsua dela esan nahi du).

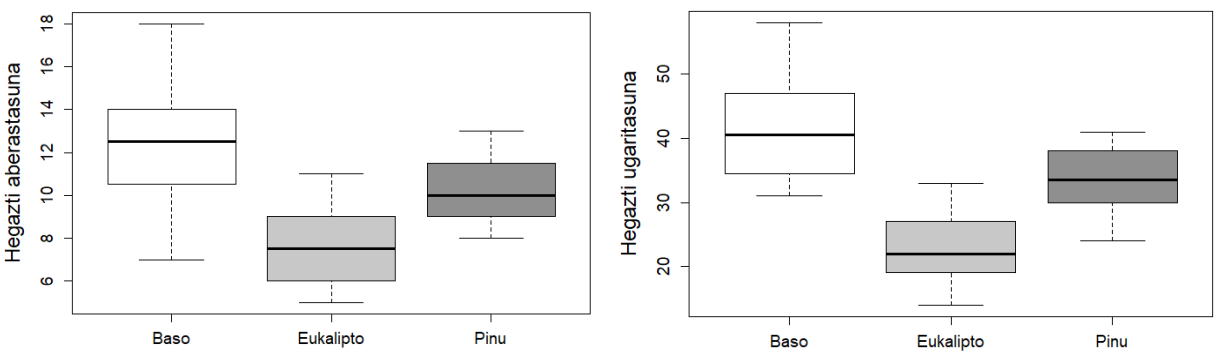
3.2 Emaitzak eta eztabaida

1948 hegazti kontatu ziren guztira, 454 eukaliptoetan, 670 pinuetan eta 824 basoetan. 33 hegazti espezie identifikatu ziren guztira, 20 eukalipto partzeletan, 25 pinuetan eta 31 basoetan. Horietatik, 8 espezie aurkitu ziren basoetan soilik: *Alcedo atthis*, *Anthus trivialis*, *Cettia cetti*, *Motacilla cinerea*, *Phoenicurus ochruros*, *Poecile palustris*, *Sitta europaea* eta *Turdus viscivorus*. 2 espezie aurkitu ziren landaketetan soilik: *Carduelis carduelis* (bi landaketetan) eta *Dendrocopos major* (pinu landaketetan soilik). Hegaztien ugaritasunean ($F = 49,07$, $p < 0,001$) eta aberastasunean ($F = 23,25$, $p < 0,001$) desberdintasun esanguratsuak aurkitu ziren sistemen artean (1. irudia). Hegazti aberastasuna eta ugaritasuna baxuagoa izan zen landaketetan basoetan baino, eta eukaliptoetan pinuetan baino (1. taula).

1. taula. Tukey probarekin lortutako ezberdintasunen behe eta goi-balioak eta p balioa binakako konparaketa bakoitzerako. B: basoak, E: eukaliptadiak eta P: pinudiak. Behe eta goi-balioen artean 0 balioa ez badago, ezberdintasuna esanguratsua da ($p < 0,05$).

	Sistema pareak	Behe-balioa	Goi-balioa	p balioa
Hegazti aberastasuna	E – B	-6,429	-3,071	< 0,001
	P – B	-3,829	-0,471	0,009
	P – E	0,921	4,279	0,001
Hegazti ugaritasuna	E – B	-23,015	-13,985	< 0,001
	P – B	-12,215	-3,185	< 0,001
	P - E	6,285	15,315	< 0,001

1. irudia. Hiru sistemen (baso, eukaliptadi eta pinudi) hegazti aberastasun eta ugaritasunaren arteko ezberdintasunak.



Aberastasun eta ugaritasunak handiagoak izan ziren basoetan landaketetan baino. Beraz, baso naturalek hegazti espezieentzako habitat egokiagoa eskaintzen dutela esan daiteke. Lortutako emaitzak beste ikerketa batzuetan lortutako emaitzekin bat datoz. Esaterako, baso autoktono eta eukaliptoen arteko desberdintasunak Galizian eta Portugalen ikusi izan dira (Bas et al., 2018; Goded et al., 2019; Proença et al., 2010), baita Urdaibain ere (De la Hera et al., 2013).

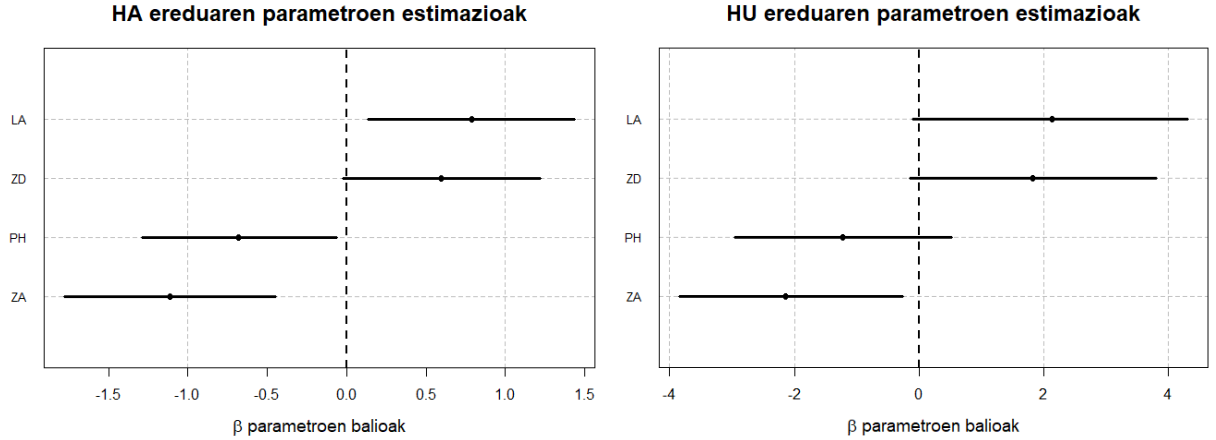
Baso eta pinu arteko desberdintasunak txikiagoak izan ziren baso eta eukaliptoenak baino. Ikerketa eremuan, pinu partzela asko baztertuta utzi dira azken hamarkadetan, jabeen belaunaldi aldaketa eman ez delako (Michel, 2006). Ondorioz, segida naturalak aurrera egiten du (Onaindia eta Mitxelena, 2009) eta pinudien oihanpean espezie autoktonoak hazten dira (López-Marcos et al., 2020), bertako hegaztientzako erakargarriagoak direnak (Goded et al., 2019).

Horrez gain, gure emaitzen arabera, pinu landaketek eukaliptoek baino habitat hobea eskaintzen dute hegaztientzat eremu honetan, espezieen aberastasun eta ugaritasuna altuagoa izan baitzen. Hortaz, pinua eukaliptoagatik ordezkatzean, pinudietan egon daitekeen aberastasuna galtzeko arriskua dago.

Lau eredu sortu ziren hegazti aberastasunean eragiten duten aldagaiak aztertzeko. Eredu guztien DIC balioak 266,9 eta 268,2 artean egon ziren. Bi puntu baino gutxiagoko aldea ez da nahiko ereduen desberdinketa egiteko. Hortaz, D_{∞} balio baxuena zuen (548,674) eredua aukeratu zen (LA, ZD, ZA eta pH aldagaiak zituen eredua). Sistemen artean ez ziren ezberdintasun esanguratsuak aurkitu (α_E: 8,963 eta 10,779; α_B: 9,487 eta 10,985; α_P: 9,421 eta 11,174 balioen artean). Hori dela eta, eredu berri bat sortu zen, hierarkiarik gabekoa, sistemaren efektua kenduz. Eredu berriaren DIC eta D_{∞} balioak baxuagoak izan zirenez (265,754 eta 531,935 hurrenez hurren), hierarkiarik gabeko eredu berri hau aukeratu zen. Eredu horren arabera, hegaztien aberastasunean eragin esanguratsu handieneko aldagaia zuhaitz dentsitatea izan zen (2. irudia). Zuhaitzen altuerak eta pH-ak ere eragin esanguratsua izan zuten; ez ordea, landare aberastasunak, nahiz eta eredua sortzeko baliagarria zen aldagaia izan (2. irudia).

Hegaztien ugaritasunari dagokionez, DIC eta D_{∞} balio baxuenak lortu zituen eredua aukeratu zen, 385,78 eta 3945,614 hurrenez hurren. Beraz, hegaztien aberastasunerako erabilitako eredu berdina erabili zen hegaztien ugaritasunerako. Hierarkia gabeko eredua sortu zen sistemen arteko ezberdintasunak kontuan hartu behar ziren konprobatzeko. Hala ere, eredu berri horrek DIC eta D_{∞} altuagoak izan zituzten (389,341 eta 4092,845 hurrenez hurren). Beraz, eredu berria baztertu eta hierarkiadun eredua erabili zen analisirako, hau da, sistema kontuan hartzen duen eredua. Kasu horretan, eragin esanguratsu bakarra zuhaitzen dentsitatea izan zen (2. irudia). Gainontzekoak ez ziren esanguratsuak izan, nahiz eta pH-aren eta landare aberastasunaren kasuetan hurbil egon.

2. irudia. Bi ereduetan lortutako parametroen estimazioen balioak: puntuak bataz bestekoa irudikatzen du eta lerroek lortutako balioen sinesgarritasun tarteak (CI, %95; 0 balioa ikutzen ez duten parametroek eragin esanguratsua dute). Ezkerrean hegazti aberastasunari (HA) dagokion ereduaren parametroen estimazioak ageri dira eta eskuman hegazti ugaritasunari (HU) dagokion ereduarenak.



Basoaren egiturak hegaztietan eragina duela ikusi da beste lan batzuetan ere (De la Hera et al., 2013). Arrazoietako bat egiturak landareetan duen eragina izan daiteke. Izan ere, zuhaitzen dentsitate handiak baliabideen erabilgarritasuna gutxitzen du eta konpetentzia asko handitzen da landareentzako (Duan et al., 2019), horien aberastasuna gutxituz. Landare espezie gehiago dagoen lekuetan, hegaztiek elikagaiak lortzeko aukera gehiago dituzte (Proença et al., 2010) eta hegazti aberastasuna handitzen du orokorrean. Zuhaitz eta landare belarkara espezie asko egoteak, esaterako, hegaztien aberastasuna igotzen du basoetan (Gil-Tena et a., 2008; Goded et al., 2019). Hortaz, landare eta hegazti aberastasunak lotura estua dute baso ekosistemetan.

Aipatu bezala, landaketetan baso naturaletako zuhaitzak berez hazteko aukera dago. Hala ere, landaketak mozterakoan arraseko mozketa bezalako metodoak erabiltzen direnean, bertako landareak galdu egiten dira, landaketaren hasierako puntura bueltatuz. Gainera, zuhaitzak mozten direnez, eremu horietan zuhaitz zaharrak agertzea arraroa izaten da. Espezie batzuek, *Sitta europaea* kasu, zuhaitz zahar horiek behar izaten dituzte bizi ahal izateko (Sánchez-Oliver et al., 2014); horregatik, landaketak espezie horientzako kaltegarriak izaten dira zenbait kasutan (Ashman et al., 2020).

Hegaztien aberastasunean pH-ak eragina duela erakusten dute gure emaitzek. Lurzoruaren propietate garrantzitsua da pH-a, lurzoruaren emankortasuna eta prozesu biogeokimikoak erregulatzen baititu (Hong et al., 2019) eta landareentzako eskuragarri dauden lurzoruko elikagaietan eragiten du. Elikagaiak maila desegokietan agertzea eragin dezake adibidez, lurzoruan defizientzia edo toxizitatea sortuz; eta, muturreko balioek lurzoruaren egitura alda dezakete (Ibarra et al., 2009). Ondorioz, landare konposizioa pH-arekin aldatu egiten da, elikagaien erabilgarritasuna aldatzen delako hain zuzen (Pabian eta Brittingham, 2012). Gure emaitzetan ikusi dugunaren antzera, pH balio altuagoak hegazti espezie kopuru altuagoekin lotu dira, landaretzan duen eraginagatik (Pabian eta Brittingham, 2012).

4. Ondorioak

Bizkaiko landaketa nagusienetan hegazti aberastasun eta ugaritasun gutxiago dago baso natural autoktonoetan baino. Azken horiek, habitat egokia eskaintzen dute baso-hegaztientzako; eta horregatik, dauden basoak babestea ezinbesteko helburu eta ekintza izan beharko litzateke kudeaketan. Horrez gain, pinu landaketetan, eukaliptoetan baino aberastasun eta ugaritasun handiagoak daudela diote gure emaitzek. Ematen ari den aldaketen markoan, kudeaketaren inguruko gogoeta egin behar dugu gizartean eta baso landaketen kudeatzeko modua ondo aukeratu behar da: zein espezie erabili, nola eta non landatu, zuhaitzak nola moztu... Kudeaketa iraunkor bat lortzeko nahitaezkoa da ekosistema eta bizidun autoktonoak babestu eta laguntzea.

5. Etorkizunerako planteatzen den norabidea

Lan honetan hegaztien dibertsitatea izan da ardatza, baso sistema ezberdinen eta basoaren ezaugarriek dituzten efektuak ikusteko. Beste talde batzuen (landareak esaterako) biodibertsitatean ematen diren efektuak aztertzea garrantzitsua eta interesgarria izango litzateke, lan honetan lorturiko emaitzak beste talde batzuetan ematen diren jakiteko eta informazioa osatzeko. Garrantzitsuak izan daitezkeen beste faktore batzuk kontuan hartzea interesgarria izan daiteke ere, esaterako, paisaiak hegaztietan izan dezakeen efektua aztertzea. Bestalde, espezieen konposizioa begiratzea garrantzitsua da, espezie bakoitzaren portaerak ezagutzeko; bai sistemen aurrean, baita basoen ezaugarrien aurrean.

6. Erreferentziak

Ainz, M. J. (2008). El monocultivo de pino radiata en el País Vasco: origen y claves de permanencia de un sistema de explotación contrario al desarrollo sostenible, *Estudios Geográficos*, 265, 335-356.

Aizpuru, I.; Aseginolaza, C.; Uribe-Echebarría, P. M.; Urrutia, P.; Zorrakin, I.; 2000: *Claves ilustradas de la flora del País Vasco y territorios limítrofes*, Servicio Central de Publicaciones del Gobierno Vasco, Vitoria-Gasteiz.

Amezaga I.; Onaindia, M. (1997). The effect of evergreen and deciduous coniferous plantations on the field layer and seed bank of native woodlands, *Ecography*, 20, 308-318.

Amezaga, I.; Gonzalez Arias, A.; Domingo, A.; Echeandia, A.; Onaindia, M. (1997). Atmospheric deposition and canopy interactions for conifer and deciduous forests in Northern Spain, *Water, Air, and Soil Pollution*, 97, 303-313.

Aragón, A. (1998). Labores forestales en Gipuzkoa durante los siglos XVI-XVIII, *Zainak*, 17, 111-126.

Ashman, K. R.; Rendall, A. R.; Symonds, M. R. E.; Whisson, D. (2020). Understanding the role of plantations in the abundance of an arboreal folivore, *Landscape Urban Planning*, 193, 103684.

Barraqueta, P.; Basagoiti, M. (1988). Producción de hojarasca y aporte de nutrientes en plantaciones de Pinus radiata en el País Vasco, *Biología ambiental: actas del Congreso de biología ambiental (II Congreso Mundial Vasco)*, 1, 411-426.

Bas, S.; Guitián, J.; Ssobral, M. (2018). Biodiversidad en plantaciones de eucalipto y en robledales del sur de Galicia: plantas y aves, *Acta Cient. Compostelana (Bioloxia)*, 25, 71-81.

Brockerhoff, E. G.; Ecroyd, C. E.; Lleckie, A. C.; Kimberley, M. O. (2003). Diversity and succession of vascular understory plants in exotic Pinus radiata plantation forests in New Zealand, *Forest Ecology and Management*, 185, 307-326.

Brower, J. E.; Zar, J. H. (1979). *Field and laboratory methods for general ecology*: Wm. C. Brown Company publisher, Dubuque, Iowa.

Calviño-Cancela, M. (2013). Effectiveness of eucalypt plantations as a surrogate habitat for birds, *Forest Ecology and Management*, 310, 692-699.

De la Hera, I.; Arizaga, J.; Galarza, A. (2013). Exotic tree plantations and avian conservation in northern Iberia: a view from a nest–box monitoring study, *Animal Biodiversity and Conservation*, 36.2, 153-163.

Duan, A.; Lei, J.; Hu, X.; Zhang, J.; Du, H.; Zhang, X.; Guo, W.; Sun, J. (2019). Effects of Planting Density on Soil Bulk Density, pH and Nutrients of Unthinned Chinese Fir Mature Stands in South Subtropical Region of China, *Forests*, 10, 351-367.

Edeso, J. M.; Merino, A.; González, M. J.; Marauri, P. (1998). Manejo de explotaciones forestales y pérdida de suelo en zonas de elevada pendiente del País Vasco, *Cuaternario y Geomorfología*, 12(1-2), 105-116.

Elosegi, A.; Cabido, C.; Larrañaga, A.; Arizaga, J. (2020). Efectos ambientales de las plantaciones de eucaliptos en Euskadi y la península ibérica, *Munibe, Cienc. nat.*, 68, 111-136.

Garayo, J. M. (1993). La Política Forestal en el Régimen Foral Vasco, *Revista Internacional de los Estudios Vascos*, 38(2), 63-79.

García, J. D. (2015). *Modelización del crecimiento y la producción de plantaciones de Eucalyptus globulus Labill. en el noroeste de España* (doktorego tesia): Departamento de Enxeñaría Agroforestal Escola Politécnica Superior, Lugo.

Gil-Tena, A.; Torras, O.; Saura, S. (2008). Relationships between forest landscape structure and avian species richness in NE Spain, *Ardeola*, 55(1), 27-40.

Goded, S.; Ekroos, J.; Domínguez, J.; Azcárate, J. G.; Guitián, J. A.; Smith, H. G. (2019). Effects of eucaliptus plantations on avian and herb species richness and composition in North-West Spain, *Global Ecology Conservation*, 19, e00690.

HAZI fundazioa (2022). El bosque vasco en cifras 2021. https://www.euskadi.eus/contenidos/informacion/mapa_forestal_2021/es_agripes/adjuntos/El-bosque-vasco-en-cifras-2021_ES.pdf gunean eskuragarri.

Hong, S.; Gan, P.; Chen, A. (2019). Environmental controls on soil pH in planted forest and its response to nitrogen deposition, *Environmental Research*, 172, 159-165.

Ibarra, D.; Ruiz, J. A.; González, D. R.; Flores, J. G.; Díaz, G. (2009). Distribución espacial del pH de los suelos agrícolas de Zapopan, Jalisco, México, *Agricultura Técnica en México*, 3(1), 267-276.

Larrañaga, A.; Basaguren, A.; Pozo, J. (2009). Impacts of Eucalyptus globulus plantations on physiology and population densities of invertebrates inhabiting Iberian Atlantic Streams, *International Review of Hydrobiology*, 94, 497-511.

Loidi, J.; Biurrun, I.; Campos, J. A.; García-Mijangos, I.; Herrera, M. (2011): *La Vegetación de la Comunidad Autónoma del País Vasco*, Euskal Herriko Unibertsitatea, Leioa, Bizkaia.

López-Marcos, D.; Turrión, M. B.; Bravo, F.; Martínez-Ruiz, C. (2020). Can mixed pine forests conserve understory richness by improving the establishment of understory species typical of native oak forests?, *Annals of Forest Science*, 77, 15-29.

Martin De Agar, P.; De Pablo, C. I.; Pineda, F. D.; Atauri, J. A.; Jover, M.; Prieto, C.; Schmitz, M. F.; Ugarte, F.; Latasa, I.; Garcis, A. (1992). Environmental effects of Pinus radiata D. Don plantations in the Basque Country (Spain), in A., Teller.; P., Mathy; J. N. R., Jeffers (arg.). *Responses of forest Ecosystems to environmental changes*, Springer, Dordrecht, Herbehereak, 871-873.

Michel, M. (2006): *El Pino Radiata en la Historia Forestal Vasca: Análisis de un proceso de forestalismo intensivo*, Aranzadi Zientzi Elkartea, Donostia - San Sebastián.

Onaindia, M.; Mitxelena, A. (2009). Potential use of pine plantations to restore native forests in a highly fragmented river basin, *Annals of Forest Science*, 66, 305-312.

Onaindia, M.; Ametzaga-Arregi, I.; San Sebastián, M.; Mitxelena, A.; Rodríguez-Loinaz, G.; Peña, L.; Alday, J. G. (2013). Can understorey native woodland plant species regenerate under exotic pine plantations using natural succession?, *Forest Ecology and Management*, 308, 136-144.

Onaindia, M.; Peña, L.; Fernández de Manuel, B.; Rodríguez-Loinaz, G.; Madariaga, I.; Palacios-Agúndez, I.; Ametzaga-Arregi, I. (2018). Land use efficiency through analysis of agrological capacity and ecosystem services in an industrialized region (Biscay, Spain), *Land Use Policy*, 78, 650-661.

Pabian, S. E:; Brittingham, M. C. (2012). Soil calcium and forest birds: indirect links between nutrient availability and comunity composition, *Ecosystems*, 15, 748-760.

Proença, V. M.; Pereira, H. M.; Guilherme, J.; Vicente, L. (2010). Plant and bird diversity in natural forests and in native and exotic plantations in NW Portugal, *Acta Oecologica*, 36, 219-226.

Sánchez-Oliver, J. S.; Rey Benayas, J. M.; Carrascal, L. M. (2014). Differential effects of local habitat and landscape characteristics on bird communities in Mediterranean afforestations motivated by the EU Common Agrarian Policy, *European Journal of Wildlife Research*, 60, 135-143.

Veiras, X; Soto, M. A. (2011). *La conflictidad de las plantaciones de eucalipto en España (y Portugal)*: Greenpeace, Madril.

Wang, C.; Zhang, W.; Li, X.; Wu, J. (2021b). A global meta-analysis of the impacts of tree plantations on biodiversity, *Global Ecology and Biogeography*, 31, 1-12.

Wang, Y.; Chen, L.; Xiang, W.; Ouyang, S.; Zhang, T.; Zhang, X. (2021a). Forest conversion to plantations: A meta-analysis of consequences for soil and microbial properties and functions, *Global Change Biology*, 27, 5643-5656.

7. Eskerrak eta oharrak

David Ruari eskerrak eman nahi dizkiogu laginketak egiten laguntzeagatik. Lan hau Euskal Herriko Unibertsitateak (UPV/EHU) finantziatua izan da, ikertzaileak prestatzeko kontratazio deialdiko diruaren bidez (PIF20/27).

Aljeriako behien nodulu linfatikoetatik isolatutako *Pseudochrobactrum algeriensis* espezie berriaren deskribapena eta *Pseudochrobactrum* generoa identifikatzeko tresna molekularraren garapena

Maite Loperena-Barber[1], Maamar Khames[2], Chantal Renau-Mínguez[3], Amaia Zúñiga-Ripa[1], Mireia Coscollá[3], Mustapha Oumouna[2], Ignacio Moriyón[1], Raquel Conde-Álvarez[1]

[1]Nafarroako Unibertsitatea, ISTUN Osasun Tropikaleko Institutua, Mikrobiologia eta parasitologia saila, IdiSNA (Nafarroako Osasun Ikerketa Institutua). Irunlarrea 1, PK 31008 Iruñea. [2]Laboratory of Experimental Biology and Pharmacology, Biologia saila, Medeako Unibertsitatea, PK 26000, Medea (Algeria). [3]I2SysBio Institutoa, Valentziako Unibertsitatea - CSIC, Valentzia.

mloperena@alumni.unav.es

Laburpena

Bruzelosi azterketa bakteriologiko batean, *Brucella* ez ziren hiru andui isolatu ziren Aljeriako behi batzuen nodulu linfatikoetatik. Diagnostiko tresna klasikoekin ez zen lortu bakterio horiek identifikatzea. Genomaren analisietan oinarrituta, isolatuak ia berdin-berdinak ziren eta *Pseudochrobactrum* generoan sartzen ziren, *Brucella*tik oso hurbil dagoen generoa, *Brucella* ugaztun ezberdinak kutsa ditzakeen bakterio zoonotikoa izanik. Datu genomiko, fisiologiko eta biokimikoen arabera, organismo horiek *Pseudochrobactrum* generoko espezie berri bat osatzen dute, eta *Pseudochrobactrum algeriensis* izena proposatu zen. 16S-PsO-F/R hasle bikote berria 16S rRNA genean oinarritzen da eta espezifikoki *Pseudochrobactrum* espezie guztiak detektatzen ditu.

Hitz gakoak: Brucellaceae, Pseudochrobactrum, diagnostikoa

Abstract

During a brucellosis bacteriological survey three strains were isolated from lymph nodes of Algerian cows. Classical diagnostic tools did not attribute the isolates to any known species. On the basis of genome analyses the isolates were almost identical and clearly grouped in the genus Pseudochrobactrum, a genus phylogenetically very close to Brucella, a zoonotic bacteria able to infect different mammals. Genomic, physiological and biochemical data supported that these organisms represent a novel species of the genus Pseudochrobactrum, for which the name Pseudochrobactrum algeriensis sp. is proposed. The new 16S-PsO-F/R pair of primers is based on 16S rRNA gene and specifically detects all the Pseudochrobactrum species.

Keywords: Brucellaceae, Pseudochrobactrum, diagnosis

1. Sarrera eta motibazioa

Bruzelosia mundu osoan hedatutako bakterio-zoonosi ohikoenetako bat da, batez ere behiei, ardiei, ahuntzei eta txerriei eragiten diena. *Brucellaceae* familiakoak diren *Brucella* generoko bakterioek eragiten dute gaixotasuna (Moreno et al., 1990; Moreno et al., 2002). Genero honek hainbat bizi-estilo dituzten bakterio gram-negatiboak biltzen ditu, hala nola inguruan aske bizi diren bakterioak (*Ochrobactrum* edo *Pseudochrobactrum* generoak adibidez), edota *Brucella* bezalako benetako patogenoak, immunitate-sistematik erraz ihes egiteko eboluzionatu dutenak.

Animaliengan, bruzelosiak abortua, orkitisa eta epididimitisa eragiten ditu, eta horrek kumeak galtzea, eta ugalkortasuna eta esne-errendimendua gutxitzea eragiten du. Horrela, bruzelosiak osasun publikoko arazoak eragiteaz gain, galera ekonomiko handiak eragiten ditu, abeltzaintzaren

produktibitatearen murrizketaren ondorioz, batez ere Afrika, Asia eta Latinoamerikako eremu askotan (McDermott et al., 2013; Moreno et al., 2014).

Gaixotasuna kutsatutako animaliekin kontaktu zuzena izanez edo hauen produktuak kontsumituz transmititzen zaie gizakiei, askotan pasteurizatu gabeko esnea edateagatik (Rubach et al., 2013). *Brucella* infekzioak diagnostikatzeko zaila den gaixotasun bat sortzen du gizakietan, seinale kliniko zehatzik ez duelako. Sintoma arrunten artean, sukarra, ondoeza edo mialgia daude, eta endokarditisa edo lesio muskulu-eskaletikoak bezalako konplikazioak gertatu ahal dira, kritikoak bihur daitezkeenak behar bezala tratatzen ez badira. Gizakien arteko transmisioa oso arraroa da (Ariza, 1999).

Bruzelosia endemikoa da herrialde askotan, eta bertako biztanleen pobrezia eta osasun arazoak areagotzen ditu. Izan ere, munduko 10 animalia-gaixotasun garrantzitsuenetariko bat bezala proposatu zen diru-sarrera gutxiko eskualdeetan duen eraginagatik (Perry et al., 2002) eta gaixotasun hori izan dezaketen 4.000.000 animalia inguru eremu endemikoetan daudela kalkulatu da (Ducrotoy et al., 2017).

Bruzelosiak epidemiologia konplexua du eta ez du sintoma patognomonikorik. Beraz, laborategiko probak ezinbestekoak dira diagnostiko zehatza egiteko. Prozedura diagnostiko nagusien artean, test serologikoak eta metodo bakteriologikoak daude (Ducrotoy et al., 2016).

Beste gaixotasun infekziosoetan gertatzen ez den moduan, bruzelosian test serologikoek ez dute aukera ematen infekzioa eragiten duen *Brucella* espeziea identifikatzeko; beraz, bakterioa isolatzea eta ondoren tipifikatzea beharrezkoa da gaixotasuna kontrolatzeko eta informazio epidemiologikoa lortzeko. Nahiz eta sentsibilitate gutxiago izan, proba bakteriologikoak infekzioaren behin betiko froga dira. Giza laginentzat odol kultiboa aukerakoa den bitartean (Yagupsky et al., 2020), animalien laginentzat (abortuen materialak eta baginako fluidoak) hazkuntza-medio hautakorra (de Miguel et al., 2011) funtsezkoa da *Brucella* isolatzeko (Ducrotoy et al., 2018).

Azken urteetan, bruzelosia diagnostikatzeko azterketa bakteriologikoetan, *Brucella* ez diren baina filogenetikoki hurbil dauden generoak isolatu dira askotan, diagnostiko arazoak eragiten.

2. Arloko egoera eta ikerketaren helburuak

Aljeriako gure kolaboratzaileetako batek *Brucella* ez ziren hiru andui isolatu zituen bruzelosirako seropositiboak ziren behietatik (Khames et al., 2017, Loperena-Barber et al., 2022), *Brucella* medio selektiboan (de Miguel et al., 2011), diagnostiko okerra eraginez.

Horregatik, lan honen helburuak hauek izan ziren:

1) *Brucella* hazkuntza-medio selektiboan isolatutako *Brucella* ez diren aljeriar anduiak identifikatzea eta ezaugarritzea.

2) Tresna molekular bat garatzea medio selektiboan *Brucella* ez diren koloniak aurkitzean *Pseudochrobactrum* isolatuak identifikatzeko.

3. Ikerketaren muina

3.1 C130915_07^{T}, C150915_16 eta C150915_17 *Brucella* ez diren anduiak Aljeriako behi batzuen nodulu linfatikoetatik isolatu ziren *Brucella* medio selektiboan.

Aljeriako Medea eta El-Azizia eskualdetako ukuilu eta hiltegietan egindako bruzelosia diagnostikatzeko azterketa bakteriologiko batean, *Brucella* seropositibo ziren 30 behien nodulu linfatikoak aztertu ziren (Khames et al., 2017). Nekropsiaren ondoren, nodulu linfatikoen

gainazala etanolarekin esterilizatu egin zen eta plastikozko poltsa antzuetan sartu, zigilatu eta laborategira eraman ziren izotz-kutxetan. Ustekabean, hiru andui (C130915_07^{T}, C150915_16 eta C150915_17), isolatu ziren CITA *Brucella* medio selektiboan (de Miguel et al., 2011), baina hauek ez zuten anplifikazio-bandarik eman *Brucella* detektatzeko PCR espezifikoan (López-Goñi et al., 2011).

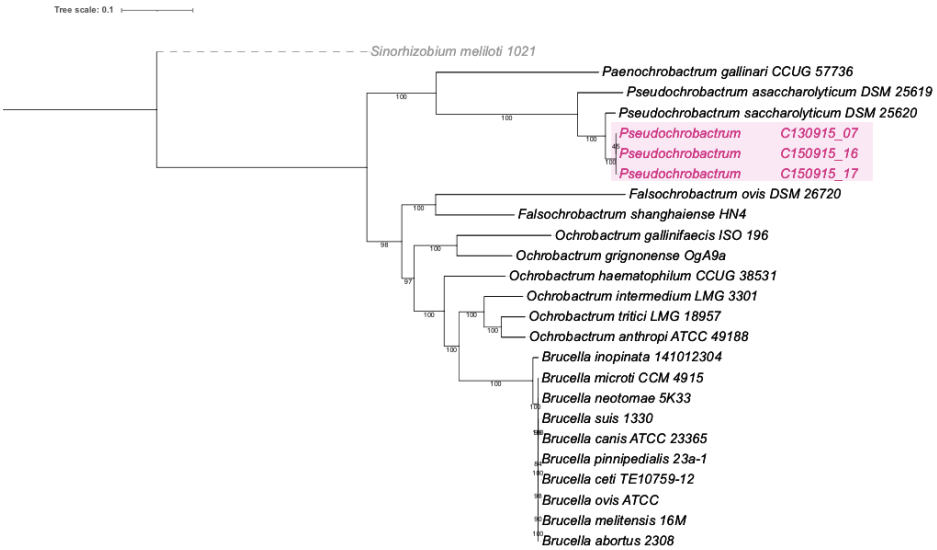
3.2 Analisi genomikoek isolatu berri horiek *Pseudochrobactrum* generokoak direla ebatzi zuten.

Brucella detektatzeko PCRaren emaitzek isolatuak *Brucella* generokoak ez zirela iradokitzen zutenez, haien posizio filogenetikoa zehaztea genuen helburu. Horretarako, 16S rRNA geneen analisi konparatiboa egin zen *Brucellaceae* taldeko beste bakterioekin.

Hiru anduien 16S rRNA geneen sekuentziak % 100ean berdinak ziren, eta % 99tik gorako antzekotasuna zuten beste *Pseudochrobactrum* espezie guztien 16S rRNA geneekin, isolatuak *Pseudochrobactrum* generokoak zirela iradokiz. Sekuentzia antzekoenak *P. lubricantis* CCUG 56963^{T} eta *P. saccharolyritum* CCUG 33852^{T} espezieenak izan ziren, konparatutako 1406 nukleotidoetatik bat eta bi diferentziekin.

Brucellaceae bakterio ezberdinen genoma osoekin zuhaitz filogenetiko bat sortu genuen (1. irudia) eta C130915_07^{T}, C150915_16 eta C150915_17 isolatuak, beste *Pseudochrobactrum* espezieekin ongi bereizten den klado baten barruan geratzen ziren, andui horiek *Pseudochrobactrum* generokoak zirela baieztatuz. *P. saccharolyticum* eta *P. lubricantis* maila genomikoan hurbilen dituzten espezieak izanda, hiru isolatuak espezie berritzat har daitezke.

1. irudia. *Brucellaceae* ezberdinekin sortutako zuhaitz filogenomikoa. ROARY eta IQ-TREE tresnak erabili ziren.



3.4 Zenbait ezaugarri fisiologikok C130915_07^T, C150915_16 eta C150915_17 isolatuak eta *Pseudochrobactrum* beste espeziak bereiztea ahalbidetzen dute.

C130915_07^T, C150915_16 eta C150915_17 isolatuen eta beste *Pseudochrobactrum* espezietako ezaugarri fenotipiko bereizgarriak 1. taulan laburbiltzen dira. Proba biokimikoak API 20NE eta Vitek 2 sistemak (BioMérieux) erabiliz egin ziren.

C130915_07^T, C150915_16 eta C150915_17 isolatuak beste *Pseudochrobactrum* espezietatik bereiz daitezke karbono substratu ezberdinak asimilatzeko duten patroiagatik (1. taula). Aurretik deskribatutako *Pseudochrobactrum* espezie guztietatik (Kämpfer et al., 2006) ezberdinak ziren zitratoa asimilatzeko gaitasunean.

1. taula. C130915_07^T, C150915_16 eta C150915_17 isolatuen eta beste *Pseudochrobactrum* espezien gaitasun fisiologiko ezberdinak. 1, C130915_07^T, C150915_16 eta C150915_17 (emaitza berberak hiru isolatuentzat); 2, *P. asaccharolyticum*; 3, *P. saccharolyticum*; 4, *P. kiredjianiae*; 5, *P. lubricantis*. +, positiboa; -, negatiboa; (+) eta (-), erreakzio ahula.

	1	2ª	3ª	4ª	5ª
Glukonatoa	-	-	-	-	-
L-arabinosa	-	-	+	-	-
D-glukosa	+	-	+	+	+
D-manosa	+	-	+	-	+
L-malatoa	+	-	+	+	+
Zitratoa	+	-	-	-	-
D-maltosa	-	-	-	-	-
N-azetil-D-glukosamina	+	+	-	(+)	+
D-manitola	-	-	-	-	-
Fenilazetatoa	-	-	-	-	-
L-laktatoa	-	+	+	+	-
D-sorbitola	-	-	-	-	-
Adonitola	-	-	-	-	-
L-histidina	(-)	-	+	-	+

3.5 Hiru isolatuak *Pseudochrobactrum* generoko espezie berri gisa proposatu ziren Mikrobiologia Sistematiko eta Ebolutiboaren Nazioarteko Aldizkarian *P. algeriensis* izenarekin, eta erreferentziazko bakterio-bildumetara bidali ziren.

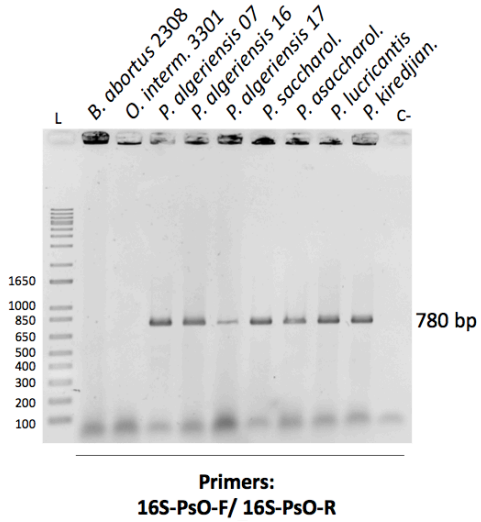
Hiru isolatuen analisi genomikoak kontuan hartuta, *Pseudochobactrum* generoko espezie berri bat proposatu genuen, *Pseudochrobactrum algeriensis* izenekoa (Loperena-Barber et al., 2022); beste *Pseudochrobactrum* espezietatik bereiz daitekeena karbono substratu ezberdinak asimilatzeko duten patroiari esker.

C130915_07^T erreferentziazko andui gisa aukeratu zen eta Belgian Coordinated Collections of Microorganisms (BCCM/LMG) eta Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) bildumentan erregistratu zen, LMG 32378 eta CECT 30232 kodeekin. Lan honetan deskribatutako beste bi isolatuak ere bilduma hauetara bidali ziren (C150915_16, LMG 32379 eta CECT 30233 bezala; C150915_17, LMG 32380 eta CECT 30234 bezala). MZ227818-MZ227820 (16S rRNA sekuentziak) eta CP075348-CP075362 (genoma osoak) dira GenBankeko hiru isolatuen datu genomikoen kodeak.

3.6 16S-PsO-F/R hasle bikote berria diseinatu genuen 16S rRNA genean oinarritua, 778 nukleotidoko banda bat anplifikatzen duena eta espezifikoki *Pseudochrobactrum* espezie guztiak detektatzen dituena.

Brucella eta *Pseudochrobactrum* generoak gaizki identifikatzea saihestuko duen tresna molekular bat izateko, PCR hasle berriak diseinatu genituen 16S rRNA sekuentzia erabiliz. 16S-PsO-F eta 16S-PsO-R hasleak 780 nukleotidoko zati bat anplifikatzen dute 165 eta 945 arteko posizioetan. 2. irudian ikus daitekenez, hasle horiek banda bakar bat anplifikatzen zuten, *Pseudochrobactrum* espezie guztietan espero zen tamainarekin, eta *Brucella* eta *Ochrobactrum* generoek ez zuten anplifikaziorik erakusten.

2. **irudia. 16S-PsO-F eta 16S-PsO-R hasleen espezifikotasun analitikoa, PCR sinplean *Pseudochrobactrum* generoa identifikatzeko. L: DNA eskailera; C: kontrol negatiboa. ADNa: *Brucella* abortus 2308, *Ochrobactrum intermedium* 3301, *Pseudochrobactrum algeriensis* (C130915_07^T, C150915_16 eta C150915_17 anduiak), *Pseudochrobactrum saccahrolyticum, Pseudochrobactrum asaccharolyticum, Pseudochrobactrum lubricantis eta Pseudochrobactrum kiredjianiae.***



4. Ondorioak

1) *Pseudochrobactrum* generoko bakterioak behietatik isolatu dira maiz *Brucella* medio selektiboan, bruzelosi diagnostiko azterketetan nahasteak eraginez.
2) Analisi genomikoetan oinarrituta, C130915_07^T, C150915_16 eta C150915_17 isolatuak *Pseudochrobactrum* espezie berri bat dira, *Pseudochrobactrum algeriensis* izenekoa, eta *P. saccharolyticum* eta *P. lubricantis*-ekin lotura estua dutenak.
3) *P. algeriensis* beste *Pseudochrobactrum* espezietatik bereiz daiteke karbono substratuak asimilatzeko duten gaitasun ezberdinengatik.
4) 16S-PsO-F/R hasle bikote berriak, 16S rRNA genean oinarritua 778 nukleotidoko banda bat anplifikatzen du, *Pseudochrobactrum* espezie guztiak detektatzen ditu eta *Brucella* generoko bakterioetatik ezberdintzea ahalbidetzen du.

5. Etorkizunerako planteatzen den norabidea

Brucella, *Ochrobactrum* eta *Pseudochobactrum* biologikoki ezberdinak diren generoen hurbiltasun genetiko estuak arazoak dakartza bruzelosia bezalako gaixotasun garrantzitsu baten diagnostikoan, baina, aldi berean, aukera paregabea da *Brucellaceae* familiaren patogeniaren eboluzioari buruzko ulermena sakontzeko. Bakterio horiek lurretik zelula barneko bizitzara egokitzeari buruzko ezagutza zabaltzeko, oso baliagarria litzateke posizio filogenomiko desberdina duten *Brucellaceae* ezberdinak alderatzea. Azkenean, konparazio horretatik lortutako informazioak *Brucella* birulentzia-mekanismoak hobeki ulertzen lagunduko liguke.

6. Erreferentziak

Ariza, J. (1999) 'Brucellosis: An update. The perspective from the Mediterranean basin', *Reviews in Medical Microbiology*.

de Miguel, M. J., Marín, C. M., Muñoz, P. M., Dieste, L., Grilló, M. J., & Blasco, J. M. (2011). Development of a Selective Culture Medium for Primary Isolation of the Main *Brucella* Species. *Journal of Clinical Microbiology*, 49(4), 1458–1463. https://doi.org/10.1128/JCM.02301-10

Ducrotoy, M. et al. (2017) 'Brucellosis in Sub-Saharan Africa: Current challenges for management, diagnosis and control', *Acta Tropica*, 165, pp. 179–193. doi: 10.1016/j.actatropica.2015.10.023.

Ducrotoy, M. J. et al. (2016) 'A review of the basis of the immunological diagnosis of ruminant brucellosis', *Veterinary Immunology and Immunopathology*. doi: 10.1016/j.vetimm.2016.02.002.

Ducrotoy, M. J. et al. (2018) 'A systematic review of current immunological tests for the diagnosis of cattle brucellosis', *Preventive Veterinary Medicine*, 151, pp. 57–72. doi: 10.1016/j.prevetmed.2018.01.005.

Kämpfer, P. et al. (2006) 'Description of *Pseudochrobactrum* gen. nov., with the two species *Pseudochrobactrum asaccharolyticum* sp. nov. and *Pseudochrobactrum saccharolyticum* sp. nov.', *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56(8), pp. 1823–1829. doi: 10.1099/ijs.0.64256-0.

Khames, M. et al. (2017) 'The characterization of *Brucella* strains isolated from cattle in Algeria reveals the existence of a *B. abortus* lineage distinct from European and Sub-Saharan Africa strains', *Veterinary Microbiology*, 211, pp. 124–128. doi: 10.1016/j.vetmic.2017.10.008.

Loperena-Barber, M. et al. (2022) '*Pseudochrobactrum algeriensis* sp. nov., isolated from lymph nodes of Algerian cattle', *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 72(2), pp. 1–7. doi: 10.1099/ijsem.0.005223.

López-Goñi, I. et al. (2011) 'New Bruce-ladder multiplex PCR assay for the biovar typing of *Brucella suis* and the discrimination of *Brucella suis* and *Brucella canis', Veterinary Microbiology*, 154(1–2), pp. 152–155. doi: 10.1016/j.vetmic.2011.06.035.

Mcdermott, J. J., Grace, D. and Zinsstag, J. (2013) 'Economics of brucellosis impact and control in low-income countries', Revue Scientifique et Technique de l'OIE, 32(1), pp. 249–261. doi: 10.20506/rst.32.1.2197.

Moreno, E. et al. (1990) '*Brucella abortus* 16S rRNA and lipid A reveal a phylogenetic relationship with members of the alpha-2 subdivision of the class Proteobacteria', *Journal of Bacteriology*, 172(7), pp. 3569–3576. doi: 10.1128/jb.172.7.3569-3576.1990.

Moreno, E. (2014) 'Retrospective and prospective perspectives on zoonotic brucellosis', *Frontiers in Microbiology*, 5. doi: 10.3389/fmicb.2014.00213.

Moreno, E., Cloeckaert, A. and Moriyón, I. (2002) 'Brucella evolution and taxonomy', *Veterinary Microbiology*, pp. 209–227. doi: 10.1016/S0378-1135(02)00210-9.

Perry, B. D. et al. (2002) 'Animal diseases and their impact on the poor', in *Investing in Animal Health Research to Alleviate Poverty.*

Rubach, M. P. et al. (2013) 'Brucellosis in low-income and middle-income countries', *Current Opinion in Infectious Diseases*, 26, pp. 404–412. doi: 10.1097/QCO.0b013e3283638104.

7. Eskerrak eta oharrak

Lan hau Nafarroako Unibertsitateko Osasun Tropikaleko Institutuari, Nafarroako Gobernuaren proiektu traktoreei (PT010 eta PT053) eta Nafarroako Gobernuaren eta Zientzia eta Unibertsitate Ministerioaren laguntzei esker egin zen.

Ekosistema zerbitzuen ebaluazioa lurraldea-antolamenduan integratzen Urdaibaiko Biosfera Erreserban

Unai Ortega, Ibone Ametzaga, Unai Sertutxa eta Lorena Peña
Euskal Herriko Unibertsitatea (Landareen Biologia eta Ekologia Saila)
Unai.ortegab@ehu.eus

Laburpena

Habitaten fragmentazioa gure planetak bizi duen biodibertsitatearen galeraren arrazoi nagusietako bat da. Horrek eragin zuzena izan du ekosistemen funtzionamenduan eta, ondorioz, ekosistemen zerbitzuen (EZ) horniduran. Horregatik, Europako Batzordeak, 2013ko komunikazio batean, Azpiegitura Berdea (AB) kontzeptua ezarri zuen, biodibertsitatea, konektibitate ekologikoa eta kapital naturala babesteko helburuarekin. Ikerlan gehienek animalien mugimenduan oinarrituta ABak identifikatzen dituzte, EZen hornidura kontuan hartu gabe. Ikerlan honetan, AB identifikatzeko metodo berri bat aurkezten da, animalien mugimendua zein EZen hornidura kontuan harturik. Metodologia berria Urdaibaiko Biosfera Erreserban (UBR) inplementatu zen. Bertako ABa identifikatzeko xedeaz, bai espezieen mugimenduan oinarrituriko ikuspuntua eta bai EZetan oinarrituriko ikuspuntua, biak integratu genituen kostu txikieneko bidea (least-cost path) deritzona erabiliz. Identifikatutako ABak UBRaren azaleraren %36 hartu zuen. EZ hornidura kontuan hartu izanari esker, ekosistema garrantzitsuak sartu ziren amaierako ABan, hala nola larre-belardiak eta padurak. Lortutako informazioa baliagarria izan daiteke erreserbako naturaguneetan lan egiten duten organizazio eta erakundeentzat.

Hitz gakoak: Azpiegitura berdea, Sare ekologikoa, Ekosistema Zerbitzuak, Gutxieneko kostuaren ibilbide-metodoa

Abstract

Habitat fragmentation is one of the major causes of the biodiversity loss our planet is experiencing. This affects the functioning of ecosystems, which in turn affects the provision of ecosystem services (ES). Therefore, in a 2013 communication, the European Commission introduced the concept of green infrastructure (GI), which aims to protect biodiversity and ecological connectivity, as well as natural capital. Most studies base their GI on the movement of animals, regardless of the supply of ES. This study presents a new method of identifying a GI, taking into account both the movement of animals and the supply of ES. The new methodology was implemented at the Urdaibai Biosphere Reserve (UBR). In order to identify the local GI we integrated a multispecies approach and an ES-based approach using the least-cost path. The resultant GI included 36% of the UBR surface. By integrating the ES-based approach, important ecosystems such as meadows and marshes were introduced into the final GI proposal. The information obtained may be useful to institutions and organizations working in the restoration of the UBR wilderness.

Keywords: Green Infrastructure, Ecological network, Ecosystem Services, Least-cost path method

1. Sarrera eta motibazioa

Habitataren galera eta paisaiaren fragmentazioa biodibertsitatearen galeraren eta espezieen galeraren eragile nagusiak dira (Haddad et al., 2015). Biodibertsitatearen galera horrek, arriskuan jartzen du ekosistemek ekosistema zerbitzuak (EZ) modu erresilientean emateko duten gaitasuna (Cardinale et al., 2012). Gainera, klima-aldaketa dela eta, espezieak in situ aldatzen diren baldintzetara egokitu beharko dira edo paisai fragmentatuetatik sakabanatu klima egokiagoak bilatzeko (Root et al., 2003). Horregatik, Europako Batzordeak, 2030erako Biodibertsitate Estrategian, proposatzen du ekosistemak hobeto babestea eta berreskuratzea (Europako Batzordea, 2020). Hala eta guztiz ere, adostasun handia dago planetaren biodibertsitatea maila onargarrian mantentzea ezinezkoa dela eremu babestuetara mugatzen bagara, eta horregatik beharrezkoak direla tresna eta kudeaketa-eredu berriak (Mola et al., 2018).

Azken hamarkadetan, lurraldea kudeatzeko eredu berri bat sortu da. Eredu horrek, paisaiaren konektibitateaz gain, haren multifuntzionaltasuna (EZ ezberdinen hornidura eskaintzeko gaitasuna) barne hartzen du, biodibertsitatea kontserbatzeko eta etorkizuneko erronkei aurre egiteko, hala nola klima-aldaketa. Eredu hau Azpiegitura Berdea (AB) da, eta honela definitzen da: kalitate handiko naturguneen sare estrategikoki planifikatua, EZ ahalik eta gehien eskaintzeko eta biodibertsitatea babesteko diseinatua eta kudeatua, bai landa- eta hiri-kokalekuetan (Cannas et al., 2018). Europa mailan, "Azpiegitura Berdea: Europako kapital naturala indartzea" (Europako Batzordea, 2013) komunikazioak Europar Batasunaren AB estrategia garatzeko oinarriak ezartzen ditu; era berean, 2030erako Biodibertsitate Estrategiak adierazten du ABa sistematikoki integratu behar dela lurralde-plangintzan (Europako Batzordea, 2020). Gainera, Europako Parlamentuaren eta Natura Berritzeari buruzko Kontseiluaren erreglamendu proposamenak helburu gisa jarri du Europako habitat degradatuen %80 lehengoratzea eta natura jatorrizko egoerara itzultzea ekosistema guztietan (Europako Batzordea, 2022). Espainiaren kasuan, Azpiegitura Berdeen eta Konektibitate eta Errestaurazio Ekologikoaren Estrategia Nazionala funtsezko plangintza-tresna da lurralde osoan hondatutako ekosistemak identifikatu, kontserbatu eta berreskuratzeko, eta haien artean, inguruko lurraldeekin eta sistema ekologikoekin lotzeko.

2. Arloko egoera eta ikerketaren helburuak

Paisaia-konektibitateari eustea funtsezkoa da populazioen iraupenerako, birkolonizazioa, urte-sasoiko migrazioa eta sakabanaketa bezalako prozesu dinamikoen ondorioz. Intereseko espezieen mugimenduei buruzko behaketetan oinarritutako loturak edo korridoreak identifikatzea estrategia aproposa litzateke eskualde baterako sare ekologikoak eraikitzeko (Feng et al., 2021). Izan ere, sare ekologiko koherente horien garapenak garrantzi handia izan du biodibertsitatea kontserbatzeko politiketan (Gurrutxaga & Saura, 2014). Ikerketa horietako gehienak espezie bakar baten mugimenduari buruzkoak dira (Feng et al., 2021; Gantchoff et al., 2021), eta oraintsuago, berriz, gero eta interes handiagoa dago espezie anitzentzako konektibitatea modelatzeko, elkarrekin bizi diren espezieen eta haien prozesu ekologikoen behar desberdinak asetzeko (Liu et al., 2018; Almenar et al., 2019). Gainera, azterlan batzuek EZen horniduran oinarritzen dituzte beren sareak, azpiegitura ekologikoen plangintzan EZren balioa maximizatzeko (Lee et al., 2014; Cannas et al., 2018).

Euskal Autonomia Erkidegoan (EAE) habitat naturalak oso fragmentatuta daude, industria guneen, nekazaritzaren intentsifikazioaren, baso-ustiapenaren eta lurraldeak jasan duen urbanizazio handiaren ondorioz (Gurrutxaga et al., 2010). Lurralde-Antolamendurako Gidalerro berriak (LAG) lurraldearen ABak identifikatzeko eta definitzeko arduradunak izan ziren. Horrela, EAEko ABa honako hauek osatzen dute: naturgune babestuak, naturgune garrantzitsuak eta aurreko hauek lotzen dituzten korridore ekologikoak. Hala ere, LAGek udalerrien eta eremu funtzionalen esku uzten dute ABren identifikazioa beren lurraldeetan eskala txikiagoetan (Eusko Jaurlaritza, 2016).

Lan honetan, Urdaibaiko Biosfera Erreserban (UBR) ABa identifikatzeko metodologia bat proposatu da, espezieen mugimendua kontuan hartuta zein EZn hornidura, biodibertsitatea eta paisaiaren konektibitatea babesteko helburuarekin.

3. Ikerketaren muina

3.1. Ikerketa gunea

Ikerketa hau Urdaibaiko Biosfera Erreserban (UBR) burutu zen. Erreserba honetan bertako basoak oso fragmentatuak aurkitzen dira espezie exotikoen baso-landaketen ondorioz (*Pinus radiata* D. Don eta *Eucalyptus globulus* Labill). Baso-landaketek UBRen azaleraren %50 hartzen duten arren

(Castillo-Eguskitza et al., 2017), interes ekologiko handiko flora- eta fauna-mota ugari aurki daitezke, hala nola artadi kantauriarrak.

3.2. ABren identifikazioa

ABa identifikatzeko bi ikuspuntu erabili ziren: Hiru espezien mugimendua kontuan hartutako ikuspuntu bat eta EZen hornidura kontuan hartutako beste ikuspuntu bat (Liquete et al. 2015). Bi ikuspuntuak burutzeko metodologia berdina erabili zen, lehenengo konektatu beharreko gune nagusiak identifikatuz (Nukleo eremuak) eta ondoren konektibitate analisia burutuz. Konektibitate analisia egiteko gutxieneko kostuaren ibilbide-metodoa erabili zen bi ikuspegietan. Horretarako *Linkage mapper* tresna erabili zen zeinak nukleo eremuen arteko ibilbide motzenak (LCP) identifikatzen dituen, paisaiaren elementuek espezieen mugimendua oztopatzen duten edo EZen hornidura murrizten duten kontuan hartuta. Tresna honek LCPak identifikatu ondoren korridore ekologikoak irudikatzen ditu. Hauek ibilbide zabalagoak dira LCPen inguruan eta biologikoki errealistagoak dira kontserbazioaren plangintzarako.

3.2.1. Espezie anitzen mugimendua kontuan hartzen duen ikuspuntua

Lehenik eta behin, aurretik egindako lanetan oinarrituta eta datuen eskuragarritasuna kontuan hartuta, lurraldean funtsezkoak diren eta ugaztun talde ezberdinak ordezkatzen dituzten hiru espezie hautatu ziren (Eusko Jaurlaritza, 2016):

• Orkatza (*Capraelus capraelus*): Baso hostoerorkor eta mediterraneoetan bizi da, oihanpe ugariko baso itxietan gehien bat, eta tarteka larreetan, sastraketan eta espazio irekietan aurkitu daiteke. Lurraldeko ugaztun handien taldearen ordezkari gisa aukeratu zen.
• Lepahoria (*Martes martes*): Hostoerorkorren eta koniferoen basoetan bizi da. Leku irekiak eta giza eragozpenak saihesten ditu. Mesomamiferoen taldearen ordezkari gisa hautatu zen.
• Muxar grisa (*Glis glis*): Baso-habitateko espezialista da. Baso hostoerorkor edo mistoetan bizi da. Etxaldeetatik eta parkeetan ere agertu daiteke. Ugaztun txikien taldearen ordezkari gisa aukeratu zen.

Bigarrenik, nukleo eremuak baso motaren eta baso horien tamainaren arabera hautatu ziren. 20 ha-tik gorako baso autoktonoak (baso misto atlantikoak, ibar-basoak eta artadi kantauriarrak) hautatu ziren (Eusko Jaurlaritza, 2016). Amaitzeko, espezie bakoitzak mugitzerako orduan dituen lehentasunak kontuan hartuta, konektibitate-analisi bat egin zen espezie bakoitzarentzat sare-ekologikoak identifikatzeko. Horretarako, lurzoru-erabilera bakoitzari 1etik 1000ra bitarteko erresistentzia-balioak esleitu zitzaizkion, espezie bakoitzaren mugimendua zenbateraino oztopatzen duten arabera. Datu hauek EAErako Azpiegitura Berdearen Proposamenetik (Eusko Jaurlaritza, 2016) lortu ziren.

Hurbilketa honetan, 13 nukleo eremu identifikatu ziren. Gehienak UBRren iparraldean aurkitzen ziren. Haietatik handienak artadi kantauriarrei zegozkien. Txikienak, ordea, baso misto atlantikoak ziren. Emaitzek adierazten zutenez, nukleo eremu horiek 23 korridorek lotzen zituzten orkatzaren sare ekologikoan (azalera: 1042 ha; batez besteko luzera: 4,4 km), 20 korridorek lepahoriarenean (azalera: 1380 ha; batez besteko luzera: 4,8 km), eta 23 korridorek muxar grisarenean (azalera: 610 ha; batez besteko luzera: 4,5 km). Guztira hiru sare ekologikoen korridoreek 1900 ha-ko azalera bete zuten, non %26a bi espezierentzat baliagarria zen eta %16a hiru espezieentzat. Korridore hauek, oro har, hirigune handienetatik eta artifizializatutako eremuetatik urruntzen ziren, batez ere lepahoriaren korridoreen kasuan. Muxar grisaren korridoreak estuenak ziren, eta baso-landaketak saihesteko baso misto atlantikoak eta ibar-basoak aprobetxatzen zituzten. Orkatzaren eta lepahoriaren korridoreak, aldiz, zabalagoak ziren, eta ez zituzten koniferoen baso-landaketak saihesten.

3.2.2. EZen hornidura kontuan hartzen duen ikuspuntua

Ikuspuntu honetan, lehenik eskualdeko 7 erregulazio-zerbitzu garrantzitsuenak (Peña et al., 2020) aukeratu ziren: Ziko hidrologikoa erregulatzea, polinizazioa eta hazien sakabanatzea, karbono bahiketa, airearen kalitatea erregulatzea, habitata mantentzea, lurzoruaren emankortasunaren mantentzea eta suteen aurkako babesa. Ondoren, EZ hauen hornidura kartografiatu zen 1. Taulako indikatzaileak erabilita (Haines-Young & Potschin-Young, 2018; Peña et al., 2020).

1. Taula AB identifikatzeko aukeratutako EZ-ak, haien indikaitzaileak eta hauek kalkultzeko jarraitu den metodologia

Ekosistema zerbitzua	Indikatzailea	Kalkulatzeko metodologia
Ziklo hidrologikoa erregulatzea	Uraren Atxikipen Indizea (Water Retention Index)	**WRI = (WRv Rv + WRgw Rgw + WRs Rs + Wslope Slope + WWB RWB) * (1-Ra/100)** Non: WRI = Uraren Atxikipen Indizea WR_v, WR_{gw}, WR_s, W_{slope}, WWB = Aldagai bakoitzari esleitutako pisuak R_v = Landarediak eragindako atxikipena R_{gw} = Lurpeko uretako atxikipena R_s = Lurzoruak eragindako atxikipena RWB = Ur-masen atxikipena R_a = Lurra iragazkaiztea
Polinizazioa eta hazien sakabanatzea	Habia egiten duten Polinizatzaileen Ugaritasunaren Indizea	InVEST programaren polinizazio modulua
Karbono bahiketa	Karbono-biltegiratze osoa (Total Carbon Storage)	**TC = CLB + CDB + CS** Non: TC = Karbono-biltegiratze osoa (tC/ha) CLB = C edukia biomasa bizian (tC/ha) CDB = C biomasa hila (tC/ha) CS = TC edukia lurzoruan (tC/ha)
Airearen kalitatea Erregulatzea	Airetik NO_2 ezabatzeko gaitasuna.	**CE NO_2 = C NO_2 * Rd NO_2** Non: CE NO_2 = Airetik NO_2 ezabatzeko gaitasuna ($\mu g/m^2s$). C NO_2 = Urteko NO_2 kontzentrazioren bataz bestekoa airean ($\mu g/m^3$) Rd NO_2 = Hostoetan NO_2-ren deposizio lehorraren abiadura (ms^{-1})
Habitata Mantentzea	Habitataren Mantenuaren Indizea	**HM= W + S + P** Non: HM = Habitataren Mantenuaren Indizea W = Bertako landare-espezie baskularren aberastasuna S = Segida ekologikoaren egoera P = Babestutako eremuak edo natura-intereseko eremuak
Lurzoruaren Emankortasunaren Mantenua	Lurzoruko goiko 30 cm-etan biltegiratutako karbono organikoaren edukia.	Eskuragai dagoen EAEko lurzoruko goiko 30 cm-etan biltegiratutako karbono organikoaren mapa erabili zen.
Suteen Aurkako Babesa	Baso-erregaien modeloak	Euskal Autonomia Erkidegoan suteen aurkako babes-plan bereziaren barruan aurkitzen diren baso-erregaien ereduak erabili ziren.

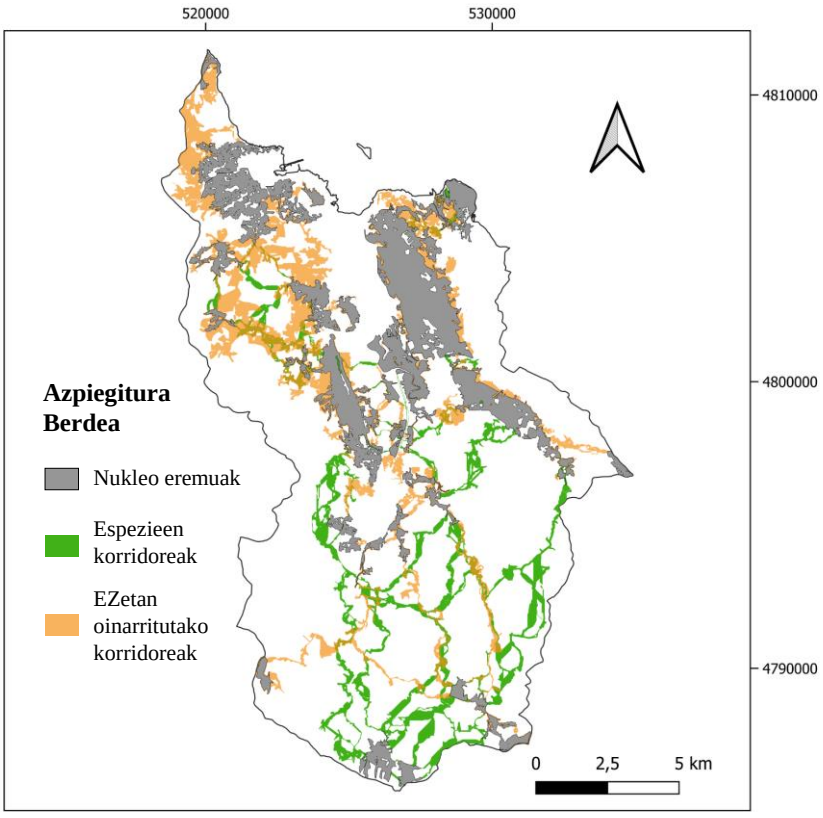
EZ kopuru handiena hornitzeko gai ziren eremuak area multifuntzional gisa identifikatu ziren eta haietatik 20 ha baino handiagokoak nukleo eremu gisa erabili ziren konektibitate analisirako. Azkenik, konektibitate analisia burutu zen aukeratutako eremuen arteko ibilbideak identifikatuz EZn hornidura handienetako eremuetatik. Horretarako, eremu bakoitzari 1etik 1000ra bitarteko erresistentzia-balioak esleitu zitzaizkion, EZn horniduraren arabera.

Ikuspuntu honetan 27 nukleo eremu identifikatu ziren. Hiru ugaztunen mugimenduetan oinarrituriko ikuspuntuan identifikatutako nukleo eremu guztiak bat zetozen eremu multifuntzionalekin, hegoaldean kokaturik zeuden bi izan ezik. Beste guztiak EZ hornidura handia eskaintzen zuten larre-belardiak eta padurak osatzen zituzten. Nukleo eremuak 39 korridorek lotzen zituzten (azalera: 2586 ha; batez besteko luzera: 2,2 km).

3.2.3. Amaierako Azpiegitura Berdea

Bi ikuspuntua konbinatuz, amaierako ABa lortu zen (1. irudia). Korridore guztien azalerak 3872 ha hartu zituen, eta nukleo eremuenak 3391 ha. Beraz, amaierako ABren azalerak UBR osoaren %36 hartu zuen. Amaierako ABren ekosistema ohikoena baso autoktonoak ziren (%37,4), eta ondoren baso-landaketak (%35,2). EZen hornidura kontuan hartu izanari esker, beste motako ekosistema garrantzitsuak ere sartu ziren amaierako ABan, hala nola larre-belardiak eta padurak.

1. Irudia Animalien mugimendua eta EZn hornidura kontuan harturiko amaierako Azpiegitura Berdea.



4. Ondorioak

Erabilitako metodologiaren bidez, biodibertsitatea eta konektibitatea mantentzen lagundu ahal duen eskala txikiko ABa identifikatu ahal izan dugu, espezieen mugimendua eta EZ hornidura kontuan hartuta. ABa identifikatzeko hiru espezie erabiliz, bat erabili beharrean ikerketa askotan

bezala (An et al. 2021; Feng et al., 2021), korridore sare konplexuagoa eta handiagoa lortu izan da. Hainbat espezieren konektibitatea aztertzearen erronka, metodorik egokiena eta zein konexio-mota erabili behar den zehaztea da. Izan ere, espezie ezberdinek habitat-lehentasun desberdinak eta behar desberdinak baitituzte. Espezie bakoitzaren konektibitatea banan-banan aztertzea eta ondoren sare ekologikoak konbinatzea aukeratu dugu kasu honetan (Liu et al., 2018; Khosravi et al., 2018).

Europan gero eta garrantzi handiagoa du eremu multifuntzionalak identifikatzeak, haien kontserbazioak biodibertsitatea kontserbatzen lagun baitezake, kapital naturala mantenduz (Schindler et al., 2016). Horregatik, lan honetan, eremu multifuntzionalak identifikatu eta haien arteko loturak ere sortu ziren, eremu isolatuak izan ez zitezen eta jarraitutasuna manten zezaten. EZen horniduran oinarritutako korridoreek larre-belardiak, baso autoktonoak, padurak eta zuhaixkak aprobetxatzen dituzte gutxieneko kostuko ibilbideak sortzeko. EZ buruzko ikerketa gehienak basoei, hezeguneei eta hiri-eremuei buruzkoak badira ere, larre-belardiak ekosistema oso garrantzitsuak dira EZak kontserbatzeko eta hobetzeko (Zhao et al., 2020). Era berean, padurak oso ekosistema garrantzitsuak dira UBRan, EZ asko eskaintzen baitituzte eta hegazti migratzaile espezie askoren habitata baitira. Ekosistema hauek ez ziren kontuan hartuko aukeratutako espezieen sare ekologikoak bakarrik erabiliz.

5. Etorkizunerako planteatzen den norabidea

Hainbat azterlanek adierazi dute UBRan baso misto atlantikoen fragmentazioak eragin negatiboa izan duela biodibertsitatean eta, ondorioz, EZen horniduran (Onaindia et al., 2013). Hori dela eta, ekosistema naturalak errestauratzeak garrantzi handia hartu du eremu honetan, non hainbat erakunde eta organizazio baso autoktonoa berreskuratzeko lan handia egiten ari baitira. AB honetaz baliatuz, priorizatu ahal izango genituzke basoberritzerako egokienak diren eremuak, egungo sarearen konektibitatea, kalitatea eta ZEen hornidura hobetzeko. Horretarako zirkuitoen-teoria erabili genezake jakiteko zeintzuk diren korridore garrantzitsuenak eta zein eremutan diren sare ekologikoak ahulagoak. Gainera, espezie ezberdinetako korridoreak non gainjartzen diren aztertuz, konexiorako garrantzi handiko eremuak aurkitzen lagundu ahal digu (Liu et al., 2018). Informazio hau oso baliagarria izan daiteke errestaurazio hauetan lan egiten ari diren erakunde eta organizazioentzat.

6. Erreferentziak

Almenar, J.B., Bolowich, A., Elliot, T., Geneletti, D., Sonnemann, G. & Rugani, B. (2019). Assessing habitat loss, fragmentation and ecological connectivity in Luxembourg to support spatial planning. *Landscape and Urban Planning*, *189*, 335-351. https://doi.org/10.1016/j.landurbplan.2019.05.004

An, Y., Liu, S., Sun, Y., Shi, F. & Beazley, R. (2021). Construction and optimization of an ecological network based on morphological spatial pattern analysis and circuit theory. *Landscape Ecology*, *36*(7), 2059–2076. https://doi.org/10.1007/s10980-020-01027-3

Cannas, I., Lai, S., Leone, F. & Zoppi, C. (2018). Green infrastructure and ecological corridors: A regional study Concerning Sardinia. *Sustainability*, *10*(4). https://doi.org/10.3390/su10041265

Cardinale, B.J., Duffy, J.E., Gonzalez, A., Hooper, D.U., Perrings, C., Venail, P., Narwani, A., Mace, G.M., Tilman, D., Wardle, D.A., Kinzig, A.P., Daily, G.C., Loreau, M., Grace, J.B., Larigauderie, A., Srivastava, D.S.& Naeem, S. (2012). Biodiversity loss and its impact on humanity. *Nature*, *486*, 59–67. https://doi.org/10.1038/nature11148

Castillo-Eguskitza, N., Rescia, A.J. & Onaindia, M. (2017). Urdaibai Biosphere Reserve (Biscay, Spain): Conservation against development. *Science of the Total Environment*, *592*, 124–133. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.03.076

Europako Batzordea (2020). EU Biodiversity Strategy for 2030. Bringing nature back into our lives Communication from the Commission to the European Parliament, the Council, the Economic and Social Committee and the Committee of the Regions. Brussels, 380. https://eur-

lex.europa.eu/resource.html?uri=cellar:a3c806a6-9ab3-11ea-9d2d-01aa75ed71a1.0007.02/DOC_1&format=PDF

Europako Batzordea (2013). Green Infrastructure (GI). Enhancing Europe's Natural Capital. Communication from the Commission to the European Parliament, the Council, the Economic and Social Committee and the Committee of the Regions. http://eur-lex.europa.eu/resource.html?uri=cellar:d41348f2-01d5-4abe-b817-4c73e6f1b2df.0014.03/DOC_1&format=PDF

Europako Batzordea (2022). Proposal for a regulation of the European Parliament and of the council on nature restoration. https://environment.ec.europa.eu/publications/nature-restoration-law_en

Eusko Jaurlaritza, (2016). Propuesta metodológica para la identificación y representación de la infraestructura verde a escala regional de la CAPV. https://www.euskadi.eus/contenidos/informacion/infrverde/es_def/adjuntos/infraestructura_verde.pdf

Feng, H., Li, Y., Li, Y.Y., Li, N., Li, Y., Hu, Y. & Luo, H. (2021). Identifying and evaluating the ecological network of Siberian roe deer (*Capreolus pygargus*) in Tieli Forestry Bureau, northeast China. *Global Ecology and Conservation*, *26*, 01477. https://doi.org/10.1016/j.gecco.2021.e01477

Gantchoff, M.G., Erb, J.D., MacFarland, D.M., Norton, D.C., Tack, J.P., Roell, B.J. & Belant, J.L. (2021). Potential distribution and connectivity for recolonizing cougars in the Great Lakes region, USA. *Biological Conservation, 257*, 109144. https://doi.org/10.1016/j.chnaes.2016.12.002

Gurrutxaga, M. eta Saura, S. (2014). Prioritizing highway defragmentation locations for restoring landscape connectivity. *Environmental Conservation, 41*(2), 157-164. https://doi.org/10.1017/S0376892913000325

Gurrutxaga, M., Lozano, P.J., & del Barrio, G. (2010). GIS-based approach for incorporating the connectivity of ecological networks into regional planning. *Journal for Nature Conservation*, *18*(4), 318–326. https://doi.org/10.1016/j.jnc.2010.01.005

Haddad, N.M., Brudvig, L-A., Clobert, J., Davies, K.F., Gonzalez. A., Holt, R.D. & Townshend, J.R. (2015).Habitat fragmentation and its lasting impact on Earth's ecosystems. *Science advances*, *1*(2), 1500052. https://doi.org/10.1126/sciadv.1500052

Haines-Young, R. & Potschin-Young, M. (2018). Revision of the common international classification for ecosystem services (CICES V5. 1): a policy brief. *One Ecosystem, 3*, 27108. https://doi.org/10.3897/oneeco.3.e27108

Khosravi, R., Hemami, M.R. & Cushman, S.A. (2018). Multispecies assessment of core areas and connectivity of desert carnivores in central Iran. *Diversity and Distributions*, *24*(2), 193–207. https://doi.org/10.1111/ddi.12672

Lee, J.A., Chon, J. & Ahn, C. (2014). Planning Landscape Corridors in Ecological Infrastructure Using Least-Cost Path Methods Based on the Value of Ecosystem Services. *Sustainability*, *6*, 7564-7585. https://doi.org/10.3390/su611756

Liquete, C., Kleeschulte, S., Dige, G., Maes, J., Grizzetti, B., Olah, B. & Zulian, G. (2015). Mapping green infrastructure based on ecosystem services and ecological networks: A Pan-European case study. *Environmental Science & Policy*, *54*, 268-280. https://doi.org/10.1016/j.envsci.2015.07.009

Liu, C., Newell, G., White, M. & Bennett, A.F. (2018). Identifying wildlife corridors for the restoration of regional habitat connectivity: A multispecies approach and comparison of resistance surfaces. *PLOS ONE, 13*(11), 0206071. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0206071

Mola, I., Sopeña, A. & Torre, R. (2018). Guía Práctica de Restauración Ecológica. *Fundación Biodiversidad del Ministerio para la Transición Ecológica*. 77 pp https://ieeb.fundacion-biodiversidad.es/content/guia-practica-de-restauracion-ecologica.

Onaindia, M., Fernández de Manuel, B., Madariaga, I. & Rodríguez-Loinaz, G. (2013). Co-benefits and trade-offs between biodiversity, carbon storage and water flow regulation. *Forest Ecology and Management*, 289, 1–9. https://doi.org/10.1016/j.foreco.2012.10.010

Peña, L., Fernández de Manuel, B., Méndez-Fernández, L., Viota, M., Ametzaga-Arregi, I. & Onaindia, M. (2020) Co-creation of knowledge for ecosystem services approach to spatial planning in the Basque Country. *Sustainability*, *12*(13), 5287. https://doi.org/10.3390/su12135287

Root, T.L., Price, J.T., Hall, K.R., Schneider, S.H., Rosenzweig, C. & Pounds, J.A. (2003). Fingerprints of global warming on wild animals and plants. *Nature*, *421*(6918), 57-60. https://doi.org/10.1038/nature01333

Schindler, S., O'Neill, F.H., Biró, M., Damm, C., Gasso, V., Kanka, R. & Wrbka, T. (2016). Multifunctional floodplain management and biodiversity effects: a knowledge synthesis for six European countries. *Biodiversity and conservation, 25*(7), 1349-1382. https://doi.org/10.1007/s10531-016-1129-3

Zhao, Y., Liu, Z. & Wu, J. (2020). Grassland ecosystem services: a systematic review of research advances and future directions. *Landscape Ecology, 35*(4), 793-814. https://doi.org/10.1007/s10980-020-00980-3

7. Eskerrak eta oharrak

Eskerrak eman nahi dizkiogu Eusko Jaurlaritzari lan hau finanziatu izanagatik, ikertzaileak prestatzeko kontratazio deialdiko dirulaguntzaren bidez (PRE_2022_2_0194).

Kolesterol zunda bioortogonal baten bidezko nanoeskala mailako lipido heterogeneotasunaren behaketa zeluletan

June Olazar Intxausti[1,2], Maier Lorizate[1], Oihana Terrones[1], Jon Ander Nieto Garai[1], Xabier Contreras[1,2,3]

1. Biokimika eta Biologia Molekularra Saila, Euskal Herriko Unibertsitatea (EHU/UPV), Sarriena auzoa z/g, 48940 Leioa.

2. Biofisika Institutua (EHU/UPV, CSIC). Sarriena auzoa z/g, 48940 Leioa.

3. IKERBASQUE, Basque Foundation for Science, 48011 Bilbo.

june.olazar@ehu.eus

Laburpena

Baltsa lipidikoaren kontzeptua proposatu zenetik 20 urte baino gehiago igaro diren arren, nanoegitura horien existentziak oraindik ere eztabaidagai izaten jarraitzen du, ez baitago egitura horien nanoantolaketa ikertzeko zelula bizietan erabili daitekeen metodo ez-inbaditzailerik. Artikulu honetan kolesterol zunda bioortogonal bat garatu da (chol-N_3), zeina bereizmen handiko mikroskopiaz baliatuta, 50 nm baino gutxiagoko lipido-baltsak zelulen mintz plasmatikoan zuzenean ikusi eta karakterizatzeko metodo baliagarria den. Zunda honek kolesterol endogenoa ordezkatzen du mintz sintetiko eta zelularretan, asaldurarik gabe.

Hitz gakoak: Kolesterol zunda bioortogonala, lipido-baltsa, bereizmen handiko mikroskopia

Abstract

Although more than 20 years have passed since the concept of lipid raft was proposed, the existence of these nanostructures is still under discussion, as there are no noninvasive methods that can be used in living cells to investigate the nanoorganization of these structures. In this article, a bioorthogonal cholesterol probe (chol-N_3) has been developed which, combined with live-cell super-resolution microscopy, is a powerful method for direct observation and characterization of <50 nm lipid rafts in the plasma membrane of living cells. This probe mimics endogenous cholesterol in synthetic and cellular membranes without perturbation.

Keywords: Bioorthogonal-based cholesterol probe, lipid raft, super-resolution microscopy

1. Sarrera eta motibazioa

Mintz biologikoetan kokatzen diren molekulak bata bestearen arabera antolatzen dira, zelulen funtzionamendu egokirako plataforma definituak osatuz. Lipido-baltsen hipotesiaren arabera, mintz biologikoetan gertatzen diren lipidoen arteko zein lipido-proteina arteko elkarrekintzek kolesterolean oso aberatsak diren nanodomeinuak sor ditzakete, non mintz-proteinak kokatzen diren beren funtzio fisiologikoak betetzeko. Kolesterolez aberastutako nanoegitura horiek oso paketatuta daude, inguruko lipidoak ez bezala; azken hauek fase jariakorragoa osatzen dute. Baltsa lipidikoek funtzio biologiko gehienetan parte hartzen dute eta zenbait giza gaixotasunekin erlazionatuta daude.

Hala ere, zelulen mintz plasmatikoan nanoeskalako lipido heterogeneotasuna zuzenean ikusteko zailtasunak, lipido-baltsen existentzia kolokan jartzen du. Bereizmen handiko fluoreszentzia mikroskopian aurrerapen handiak egin diren arren, lipido nanodomeinuen zuzeneko bistaratzea eragozten dute lipidoen difusio azkarrak eta zelula mintzetan lipidook duten bizi-denbora laburrak.

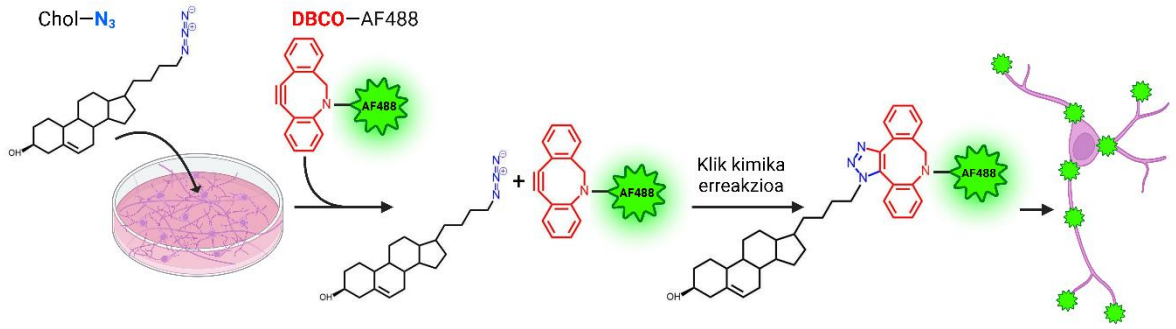
2. Arloko egoera eta ikerketaren helburuak

Orain arte, mintzaren heterogeneotasuna mikroeskalan behatu eta baieztatu da mintz-sistema modeloen eta ordenagailu bidezko simulazioen bidez, zeintzuetan lipido konposizioa moldatzeko erraza den. Kontrara, ezin izan da mintzeko lipido-baltsetan integratu daitekeen, bere analogo naturalaren banaketa eta garraio bera azaltzen dituen, eta bereizmen handiko mikroskopiarekin bateragarria den molekula fluoreszenterik garatu.

Aipatutako beharrari aurre egiteko, proiektu honetan kimika bioortogonala erabilita kolesterol analogo berritzaile bat garatu da, zeinak kolesterol molekularen 24. posizioan azida talde (N_3) bat txertatuta duen (chol-N_3). Aldaketa horrek kolesterol zundaren propietate biofisiko eta metabolikoetan duen eragina minimoa da eta, aldi berean, klik kimika erreakzioen bidez fluoreszenteki markatu eta honen dinamika jarraitzea ahalbidetzen du.

Klik kimika, orokorrean, bi biomolekulen artean lotura kobalenteak eratzen dituen erreakzio bioortogonaletan oinarritzen den metodoa da; erreakzio hauek ez dute zelularen bidezidor metaboliko naturaletan eraginik izango. Klik kimikan talde funtzional espezifikoek hartzen dute parte, haien artean lotuz erreakzio desberdinen bidez. Biokimikaren arloan, erreakzio eta talde funtzional konbinazio ohikoena “kobreak katalizatutako azida-alkino zikloadizioa” da, zeinetan kobreak biomolekula bateko azida taldearen eta beste bateko alkino taldearen arteko lotura kobalentearen eraketa katalizatzen duen. Hala ere, kobrea zelulentzako toxikoa izanik, kobrearen menpeko klik kimika erreakzioa ez da baliagarria zelula bizietan azterketa funtzionalak egiterako orduan. Horregatik, lan honetan kolesterolaren dinamika zelula bizietan ikertu denez, bestelako klik kimika erreakzio bat erabili da, azida talde baten eta dibenzoziklooktinaren (DBCO) arteko loturan datzana, hain zuzen ere. Talde funtzional hauek katalizatzaileen beharrik gabe triazol lotura bat eratuz elkartzen dira eta, beraz, erreakzioa zelula bizietan egin beharreko azterketekin bateragarria da (1. irudia).

1. irudia. Azida-DBCO klik kimika erreakzioaren irudikapen grafikoa. Neurona kortikalen kultibo zelularrean, chol-N_3-a gehitzen da, kolesterol molekularen 24. posizioan azida talde bat txertatuta duen kolesterol endogenoaren analogoa. Zeluletan txertatu ondoren, Alexa Fluor 488 (AF488) fluoroforoari lotutako DBCO molekularekin batuko da berezko klik kimika erreakzio bioortogonal baten bidez. Hala, neuronetan kolesterola txertatu den guneak fluoreszenteki markatuta azaltzen dira.



Azken urteetan, klik kimikak orain arte behatzeko zailak ziren biomolekulen markaketa espezifikoa eta hauen jarraipena egitea ahalbidetu du eta, bide honetatik, kimikaren, biologiaren zein biokimikaren alorretan metodo baliagarria dela frogatu da. Hori dela eta, teknika garatzeagatik Bertozzik, Meldal eta Sharplessek Kimikako Nobel saria jaso zuten 2022an.

3. Ikerketaren muina

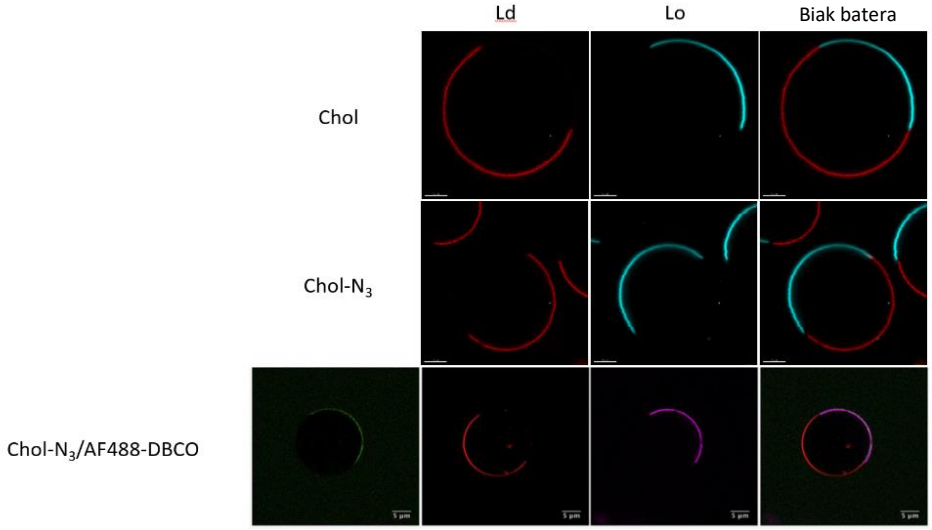
Lehenik, kolesterol zundak duen portaera ikertu zen bere analogo endogenoarekin alderatuta. Ordenagailu bidezko esperimentuek, ingurune hidrofobiko batean kokatutako chol-N_3-aren erabateko estereokimika eta topologia molekularra kolesterol naturalean (chol) antzemandakoen oso antzekoak direla erakutsi zuten.

3.1. Kolesterol bioortogonalaren azterketa

Zundan txertatutako modifikazio kimikoak jatorrizko molekularen jokabidean eraginik bazuen aztertzeko, zenbait kontrol esperimentu burutu ziren. Horietan, chol-N_3, markatua (AF488-DBCOrekin lotua klik kimika erreakzio baten bidez) zein ez-markatua, eta chol-aren jokamolde biofisikoak alderatu ziren mintz-modelo eta mintz zelularrak erabilita.

Lehenengo eta behin, Laurdan zunda fluoreszentea erabili zen. Molekula hau mintzean txertatzen da eta ingurunearen polartasunaren arabera, bere emisio espektroa aldatzen da. Horrela, likido ordenatu fasean dagoenean, bere emisio maximoa urdinerantz desplazatzen da eta likido desordenatu fasean dagoenean gorrirantz. Mintzeko baltsak batez ere likido ordenatu fasean azaltzea espero denez, Laurdan zundaren aipatutako propietateak mintzaren paketamenduan ematen diren aldaketak detektatzeko erabili daitezke. Horretarako, likido ordenatu eta likido desordenatu faseetan banatuko zirela jakina zen konposizio zehatzeko lamela bakarreko besikula erraldoiak erabili ziren. Horietan, Laurdan molekula txertatu zen, chol, chol-N_3 edo chol-N_3/AF488-DBCO-rekin batera. Guztiek mintzaren ordenamendu maila eta fase-banaketa bera erakutsi zuten, erabilitako kolesterol analogoa edozein zela ere. Gainera, chol-N_3-ak mintzeko domeinu lipidikoak induzitzeko gaitasuna duela baieztatu zen, nanodomeinuen sorrera antzekoak behatu baitziren kolesterol molekula edozein izanda ere (2. irudia).

2. irudia. Lipidoen fasekako banaketa gaitasuna lamela bakarreko besikula erraldoietan. Konposizio ezberdineko lamela bakarreko besikula erraldoietan lipidoak likido desordenatu (Ld) eta likido ordenatu (Lo) bezala banatzen dira, chol-aren, chol-N_3 analogoaren zein fluoreszenteki markatutako analogoaren presentzian.



Azkenik, chol-ak eta chol-N_3-ak zeluletan barneratzeko bidezidor bera baliatzen zuten aztertu nahi izan zen. Horretarako, zeluletan lehia froga bat egin zen: chol-N_3-aren kontzentrazioa konstante mantendu bitartean, chol-aren kontzentrazioa handitzen joan zen. Espero bezala, chol-aren kontzentrazioaren handipenak, chol-N_3-aren absortzio-maila murriztu zuen. Honek chol-N_3-ak chol-aren absortzio bidezidor bera jarraitzen zuela baieztatu zen.

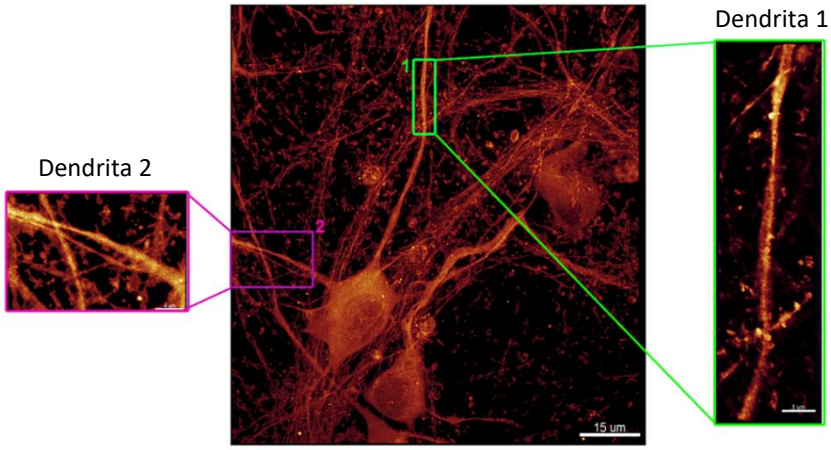
Orokorki, egindako esperimentuek chol-N_3-ak, markatuta egon zein ez, bere analogo endogenoaren modu berean jokatzen duela erakusten dute eta zelula bizietan honen jarraipenerako aproposa dela baieztatzen dute.

Behin kolesterol zundaren azterketa biofisikoa eginda, kolesterolaren detekziorako chol-N_3 zundaren bateragarritasuna aztertu zen neurona kortikaletan.

Horretarako, aldez aurretik zeluletan gehitutako chol-N_3-a, AF555-DBCO molekularekin batu zen kobrerik gabeko klik kimika erreakzio baten bidez. Markatzaileak fluoroforoa eta erreakzioan parte hartzen duen DBCO taldearen artean lotzaile bat dauka, fluoroforoak lipidoaren propietate fisiko-kimikoetan izan dezakeen eragina minimoa izate asmoz.

Neuronetan chol-N_3-aren irudi konfokalek molekularen markaketa intentsua erakusten dute, batez ere soma, axoi eta dendritetan (3. irudia). Beraz, emaitza hauek zelula bizidunetan kolesterolaren dinamika jarraitzeko zunda bioortogonalaren erabilera balioztatzen dute.

3. irudia. Chol-N_3-az tratatutako neurona kortikalen irudi konfokala. Neurona hauek kobre gabeko zikloadizio erreakzio baten bidez AF555-DBCOrekin markatu dira. Karratu berdea eta arrosa dendritetan zehar ematen den chol-N_3-aren banaketa behatzeko handipenak dira.

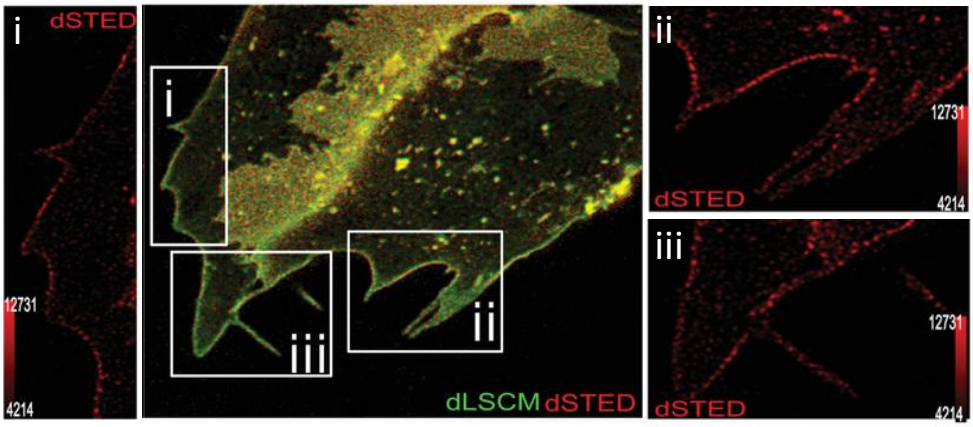


3.2. Nanoeskalako lipido heterogeneotasunaren detekzioa atsedeneko zelula bizietan

Behin kolesterol zunda berria balioztatua, kolesterolean aberatsak diren nanodomeinuen irudikapena egin zen SH-SY5Y zeluletan. Horretarako, zunda kimikoa STED (*stimulated emission depletion* siglak ingelesez) mikroskopiarekin konbinatu zen. Mikroskopia mota hau bereizmen handikoa da, nanoeskalan prozesu biologikoak xehetasun handiz (<50 nm) ebazteko erabilia, oro har.

Chol-N_3-arekin tratatutako zelulak AF488-DBCO molekularekin markatu eta bi dimentsiotako STED nanoskopia bidez ikusi ziren. Zelulen mintz plasmatikoan zeharreko kolesterolaren banaketa espazialaren bereizmen handiz ikus daiteke STED mikroskopia bidez, eta bertan domeinu nanoskopikoak daudela ikusi daiteke. Jasotako irudien handipenek 20-40 nm-tako nanomeinuak erakusten dituzte (4. irudia).

4. irudia. Kolesterolean aberatsak diren nanodomeinuak SH-SY5Y zelulen mintz plasmatikoan. Irudian STED mikroskopia (gorriz) eta mikroskopio konfokal (berdez) bidez lortutako argazkien konbinazioa beha daitezke. Chol-N_3-ren zelulan zeharreko banaketak domeinu nanoskopikoen presentzia azaltzen du mintz plasmatikoan perspektiba basaletik (i, ii eta iii).



Emaitzek kolesterolean aberatsak diren nanodomeinuak mintz plasmatikoan heterogeneoki banatuta daudela, eta tamaina eta morfologia desberdinak dituztela adierazten dute.

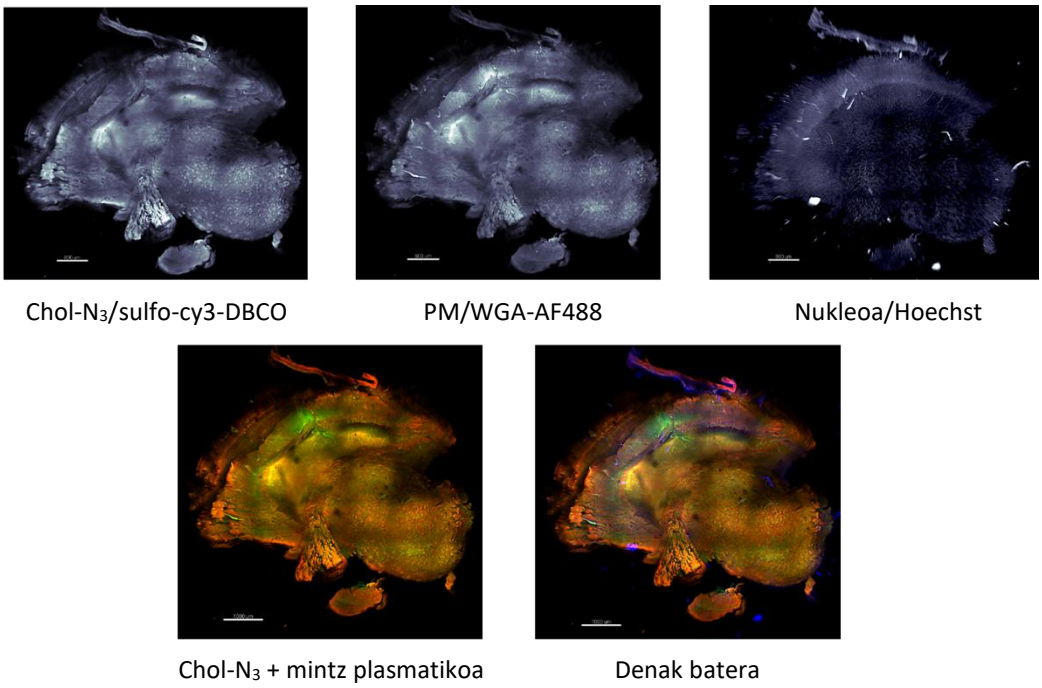
3.3. Kolesterola eta garuna

Ehunetan lipido espezieak bakarka bereizmen handian ikustea zaila izaten da, batez ere garunean, non lipido eta kolesterol kontzentrazio handiak aurki daitezkeen. Hala ere, chol-N_3-ak zeluletan azaltzen duen portaera chol-aren parekoa dela frogatu ostean, garunean hiru dimentsiotako kolesterolaren banaketa aztertu zen fluoreszentzia mikroskopioaren bidez.

Horretarako, 500 µm-tik 1 mm-ra bitarteko lodiera zuten arratoien garun-xerrak ex vivo tratatu ziren sulfo-cy3-DBCOrekin markatutako chol-N_3-arekin. Arratoiaren burmuinaren xerrak mikroskopio konfokal bat erabiliz jaso ziren eta irudikapen software baten bidez, burmuinaren hiru dimentsiotako berreraikuntza osoa burutu zen. Zelulak modu trinko eta homogeneoan markatuta azaltzen dira lagin osoan zehar (5. irudia). Emaitza horiek bat datoz burmuin zeluletan espero zitekeen kolesterolaren banaketa orokorrarekin.

Mintz plasmatikoan kolesterolean aberatsak diren egituren presentzia are gehiago berresteko, garun laginak fluoreszenteki markatutako lektina batekin (WGA-AF488) tratatu ziren, mintz plasmatikoaren markatzaile ezagun bat. Ko-lokalizazio handia behatu zen kolesterol zunda eta mintz plasmatikoaren markatzailearen artean (5. irudia).

5. irudia. Kolesterolaren banaketa garunean. Kolesterol sintetikoa sulfo-cy3-DBCO fluoroforoarekin markatu da klik kimika erreakzio baten bidez. Mintz plasmatikoa eta nukleoa WGA-AF488 eta Hoechst bidez markatu dira, hurrenez hurren.



4. Ondorioak

Oro har, fluoreszenteki markatzean jatorrizko molekularen propietate fisiko-kimiko berak mantentzen dituen eta bereizmen handiko fluoreszentzia mikroskopiarekin bateragarria den kolesterol zunda bioortogonal bat diseinatu eta garatu da. Honek, asaldurarik jasan ez duten zelula bizien gainazalean lipido-baltsak bistaratzea ahalbidetu du.

5. Etorkizunerako planteatzen den norabidea

Sintetizatutako chol-N_3-ak lipido-baltsek zelula bizien funtsezko funtzio biologikoetan duten eragina aztertzeko ikuspegi berri bat eskaintzen du. Adibidez, chol-N_3-a bereizmen altuko zelula bizien behaketarako mikroskopiarekin bateragarriak diren fluoroforoekin edo fluoreszenteki markatutako biomolekulekin (proteinak, kasurako) konbinatu daiteke. Estrategia honen bidez, nanoeskalako lipido heterogeneotasunak hartzaile bidezko seinalizazioan eta garraioan edo

bestelako prozesu zelularretan duen eragina ikertzea erraztu dezake. Amaitzeko, zunda bioortogonal honek kolesterolaren ehunetako banaketan, zein osasun eta gaixotasunetan duen eraginean sakontzeko bide berriak zabaltzen ditu, eta, horrekin batera, zunda bioortogonal berrien sintesia bultzatzen du.

6. Erreferentziak

Bernabé-Rubio, Miguel, et al. "Adaptive lipid immiscibility and membrane remodeling are active functional determinants of primary ciliogenesis." *Small Methods* 5.2 (2021): 2000711. https://doi.org/10.1002/smtd.202000711

Ipsen, J. H., Karlström, G., Mourtisen, O. G., Wennerström, H., & Zuckermann, M. J. (1987). Phase equilibria in the phosphatidylcholine-cholesterol system. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, *905*(1), 162-172. https://doi.org/10.1016/0005-2736(87)90020-4

Jacobson, K., Liu, P., & Lagerholm, B. C. (2019). The lateral organization and mobility of plasma membrane components. *Cell*, *177*(4), 806-819. https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.04.018

Králová, J., Jurášek, M., Mikšátková, L., Marešová, A., Fähnrich, J., Cihlářová, P., ... & Král, V. (2020). Influence of fluorophore and linker length on the localization and trafficking of fluorescent sterol probes. *Scientific Reports*, *10*(1), 22053. https://doi.org/10.1038/s41598-020-78085-9

Levental, I., Levental, K. R., & Heberle, F. A. (2020). Lipid rafts: controversies resolved, mysteries remain. *Trends in cell biology*, *30*(5), 341-353. https://doi.org/10.1016/j.tcb.2020.01.009

Lingwood, D., & Simons, K. (2010). Lipid rafts as a membrane-organizing principle. *Science*, *327*(5961), 46-50. https://doi.org/10.1126/science.1174621

Lorizate, M., Brügger, B., Akiyama, H., Glass, B., Müller, B., Anderluh, G., ... & Kräusslich, H. G. (2009). Probing HIV-1 membrane liquid order by Laurdan staining reveals producer cell-dependent differences. *Journal of Biological Chemistry*, *284*(33), 22238-22247. https://doi.org/10.1074/jbc.M109.029256

Mollinedo, F., & Gajate, C. (2020). Lipid rafts as signaling hubs in cancer cell survival/death and invasion: implications in tumor progression and therapy: thematic review series: biology of lipid rafts. *Journal of lipid research*, *61*(5), 611-635. https://doi.org/10.1194/jlr.TR119000439

Nieto-Garai, J. A., Lorizate, M., eta Contreras, F. X. (2022). Shedding light on membrane rafts structure and dynamics in living cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, *1864*(1), 183813. https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2021.183813

Róg, T., & Vattulainen, I. (2014). Cholesterol, sphingolipids, and glycolipids: what do we know about their role in raft-like membranes?. *Chemistry and physics of lipids*, *184*, 82-104. https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2014.10.004

Sezgin, E., Levental, I., Mayor, S., & Eggeling, C. (2017). The mystery of membrane organization: composition, regulation and roles of lipid rafts. *Nature reviews Molecular cell biology*, *18*(6), 361-374. https://doi.org/10.1038/nrm.2017.16

Vance, J. E. (2012). Dysregulation of cholesterol balance in the brain: contribution to neurodegenerative diseases. *Disease models & mechanisms*, *5*(6), 746-755. https://doi.org/10.1242/dmm.010124

7. Eskerrak eta oharrak

Proiektu hau Espainiako Zientzia, Berrikuntza eta Unibertsitate Ministerioaren (Beka Zb. PID2020-117405GB100) eta Eusko Jaurlaritzaren (Beka Zb. IT1625-22) diru-laguntzekin finantzatu da. Esker onak SGIker zerbitzuari (EHUko Biomedikuntza Zerbitzuko Mikroskopia Analitikoa eta Bereizmen Handiko Mikroskopia) eta Eusko Jaurlaritzari J.O.-I-ren doktoreak ez diren ikertzaileak prestatzeko Doktoratu Aurreko Programako laguntzagatik (2021-2022).

Partikulen azeleragailuetan mikrofoniak kontrolatzeari buruzko oinarrizko kontzeptuak: MADRC algoritmoa

Ander Elejaga, Josu Jugo, Pablo Echevarría
Euskal Herriko Unibertsitatea, Helmholtz Zentrum Berlin
ander.elejaga@ehu.eus, josu.jugo@ehu.eus

Laburpena

Artikulu honen helburu nagusia partikulen azeleragailuetan kargatutako partikulak azeleratzeko oinarrizko kontzeptuak modu errazean azaltzea da, baita mikrofoniak kontrolatzeko arloan egiten ari garen lana ezagutaraztea ere. Horrela, dibulgazio-lan honen bidez, publiko ez-zientifikoarentzat eskuragarriago bihurtu nahi da makina horiei buruzko ezagutza, zalantzarik gabe gizateriaren mugarri zientifikoak baitira. Horretarako, lehenik eta behin, partikulen azeleragailuek gaur egungo gizartean dituzten erabilerei eta garrantziari buruzko azalpen labur bat egiten da. Ondoren, makina horien funtzionamendua ulertzeko oinarri teorikoak planteatzen dira, Lorenz-en indarrak eta erresonantziak bezalako oinarrizko kontzeptuak azalduz. Azkenik, kabitate erresonante deiturikoetan nabarmen berezia egiten da, partikulak azeleratzen dituzten gailuak baitdira. Gure lana kabitate supereroaleek (SRF) jasaten duten egungo arazo bat da, mikrofonien bidezko desintonizazioa deritzona. Desintonizazio hori kabitateak jasaten dituen perturbazio mekanikoetatik dator, eta horrek eraginkortasuna galtzea dakar partikuletara energia transferitzerakoan. Horrela, proposatzen dugun soluzioa ere labur-labur aipatzen da (Modified Active Disturbance Rejection Algorithm edo MADRC), eta orain arte lortutako emaitzak azaltzen dira. Hitz gakoak: Partikula Azeleragailuak, kontrol automatikoa, mikrofoniak

Hitz gakoak: Partikula Azeleragailuak, kontrol automatikoa, mikrofoniak

Abstract

The main purpose of this article is to explain in a simple way the basic concepts for the acceleration of charged particles in particle accelerators, as well as to publicize the work that we are carrying out in the field of microphonic control. In this way, through this informative work, it is intended to make knowledge about these machines more accessible to the non-scientific public, which are undoubtedly a scientific milestone for humanity. To do this, first of all, a brief exposition on the uses and importance of particle accelerators in today's society is made. Afterwards, the theoretical bases are raised to understand the operation of these machines, explaining basic concepts such as Lorentz forces and resonances. Finally, special emphasis is placed on the so-called resonant cavities, which are the devices in which the particles are accelerated. Our work deals with a current problem suffered by superconducting cavities (SRFs) called detuning by microphonics. Said detuning derives from mechanical disturbances suffered by the cavity and translates into a loss of efficiency when transferring energy to the particles. In this way, the solution that we propose (control algorithm "Modified Active Disturbance Rejection Algorithm" or MADRC) is also briefly mentioned and the results obtained to date are exposed.

Keywords: Particle accelerator, automatic control, microphonies

1. Sarrera eta motibazioa

Partikula-azeleragailuak teknologia handiko gailuak dira, unibertsoaren funtsezko egitura aztertzen laguntzen digutenak. Gailu horiek eremu elektrikoak eta magnetikoak erabiltzen dituzte kargatutako partikulen energia zinetikoa handitzeko, hala nola elektroiak, protoiak edo ioiak, eta argiaren abiaduratik hurbil dauden abiaduretan azeleratzeko. Partikula horiek azeleratuta daudenean, materiaren izaera hobeto ulertzen laguntzen diguten esperimentuak egiteko eta elkarren artean nola elkarreragiten duten jakiteko erabiltzen dira.

Partikulen azeleragailuen erabilera nagusietako bat partikulen fisikan da, non materiaren egitura eta unibertsoa aztertzeko erabiltzen diren. Zientzialariek partikula-azeleragailuak erabiltzen dituzte partikula subatomikoen izaera eta horiek gobernatzen dituzten funtsezko indarrak ikertzeko, hala nola grabitatea [1], elektromagnetismoa eta indar nuklearra. Partikulak abiadura oso altuetan azeleratzean eta elkarren artean talka eginaraztean, partikula subatomikoek elkarren artean nola elkarreragiten duten eta energia handiko talketan nola sortzen eta suntsitzen diren azter daiteke. Horrek aurrerapen esanguratsuak ekarri ditu unibertsoaren egiturari eta bilakaerari buruz dugun ulermenean, Higgs-en Bossoia, quark top edo antimateria bezalako aurkikuntza garrantzitsuetara eramanez [2].

Partikulen azeleragailuen beste erabilera garrantzitsu bat medikuntzan da. Erradiazio-terapian, energia handiko partikula-sortak erabiltzen dira gorputzean minbizi-zelulak suntsitzeko. Partikula-azeleragailuek partikula-sortak tumoreetara zehatz-mehatz apuntatzeko aukera ematen diete medikuei, inguruko ehun osasuntsuei ahalik eta kalte txikiena eginez. Tratamendu horrek emaitza handiak eman ditu bularreko, biriketako eta prostatako minbizietan, eta horien biziraupen-tasa % 90ekoa izan da [3].

Partikulen azeleragailuak industrian ere erabiltzen dira materialak ikuskatzeko eta produktuak esterilizatzeko. Partikula-sortak material opakoetan sar daitezke, eta horrek aukera ematen du materialen konposizioa aztertzeko eta bestela ikusezinak liratekeen akatsak edo irregulartasunak detektatzeko [4]. Produktuak esterilizatzeko ere erabiltzen dira, hala nola gailu medikoak, elikagaiak eta laborategiko ekipoak.

Azkenik, partikulen azeleragailuek garrantzi handia dute energia garbiko teknologien ikerketan, hala nola fusio nuklearrean. Fusio nuklearrak, energia askatzeko atomo nukleoak fusionatzeko prozesua dena, energia iturri mugagabe eta iraunkorra eman lezake [5]. Partikula-azeleragailuak fusio nuklearra lortzeko beharrezko baldintzak ikertzeko eta fusioa energia-iturri gisa bideragarria izan dadin teknologiak garatzeko erabiltzen dira.

2. Arloko egoera eta ikerketaren helburuak

2.1 Kabitate erresonanteak

Makina oso konplexuak izan arren eta gailu asko izan arren bere barnean, azterlan honetan kabitate erresonanteak azpimarratu nahi ditugu bereziki, partikulak azeleratzeko energia-transferentzia egiten duten gailuak baitira. Horrela, bada, makina horiek eremu elektromagnetiko oszilatzaileak erabiltzen dituzte kargatutako partikuletara energia transferitzeko, Faraday-Maxwell-en legeetan eta Lorenz-en indarretan oinarrituta [6]. Kasu honetan, partikulak azeleratzeko erabiltzen diren oinarrizko kontzeptuak honako hauek dira: Alde batetik, eremu elektriko baten aurrean kargatutako partikulek Coulomben legearen bidez kalkula daitekeen indar elektriko bat jasaten dute.

$$\bar{F}_e = q * \bar{E} \tag{1}$$

Non q partikularen karga den eta $\bar{E}$ eremu elektrikoaren intentsitatea partikula dagoen puntuan. Indar elektrikoaren norabidea eremu elektrikoaren norabide berean da, karga positiboa bada, eta kontrako norabidean, karga negatiboa bada. Bestalde, kargatutako partikula eremu

magnetiko batean zehar mugitzen denean, bai partikularen abiadurarekiko, bai eremuarekiko indar perpendikular bat jasaten du, eta Lorenz-en Legearen bidez kalkula daiteke.

$$\bar{F}_m = q * \bar{v} \times \bar{B} \quad (2)$$

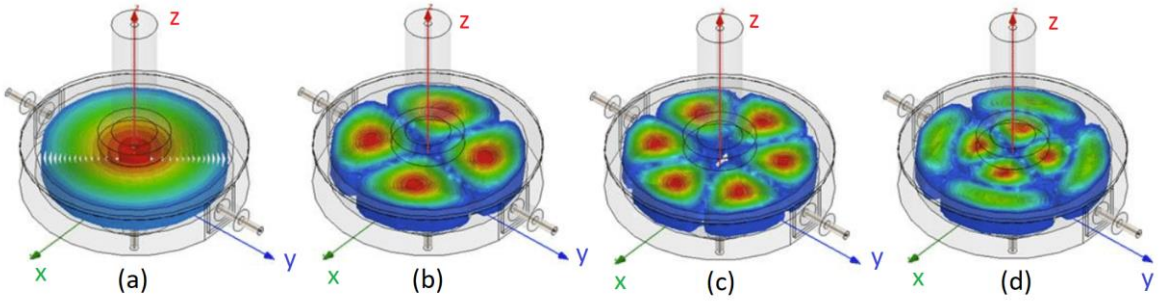
$\bar{v}$ partikularen abiadura izanik eta $\bar{B}$ eremu magnetikoaren intentsitatea. Ahalik eta eremu elektriko altuenak lortzeko, nahitaezkoa da eremu elektromagnetiko oszilakorretara jotzea. Kasu honetan, irrati maiztasunera. Eremu horiek sortzeko, kabitate erresonanteak erabiltzen dira, gehienetan zilindrikoak.

1. **irudia. Tesla motatako kabitate erresonante supereroalea**

kabitate edo barrunbe zilindrikoa zilindro formako espazio itxi eta hutsa da, material oso eroalez eginda dagoena. Barrunbean frekuentzia espezifiko batean uhin elektromagnetiko bat aplikatzen bada, bertan erresonatu egin dezake, eta horrek esan nahi du uhinaren energia barrunbean metatzen dela. Kabitate zilindriko bateko erresonantzia elektromagnetikoa matematikoki deskriba daiteke kabitatearen barruko uhin elektromagnetikoaren ekuazioaren soluzioaren bidez, eta horrek erresonantzia posibleen multzo bat lortzea dakar. Erresonantzia modu horietako bakoitzak maiztasun espezifiko bat eta lotutako uhin forma bat ditu, eta erresonantzia moduaren maiztasunetik oso hurbil edo maiztasun berdina duten uhin elektromagnetikoek bakarrik erresonatu dezakete kabitatean [7]. Garrantzitsua da kontuan hartzea erresonantzia-modu horien maiztasuna barrunbearen geometriaren mende baino ez dagoela.

Horrela, barrunbean uhin elektromagnetiko bat injektatzen da, *Tm010* (*transverse magnetic*) modua kitzikatzeko behar den maiztasunarekin, 2. irudian ikusten dena. Horrela, gradiente oso altuko eremu elektriko bat sortzen da kabitatearen ardatzaren norabidean. Ondorioz, kargatutako partikula batek zeharkatzen duenean, eremu elektrikoa hautematen du eta horren intentsitatearen arabera azeleratzen da. Aldi berean, eremu magnetiko azimutal bat ere sortzen da, partikulak erdiko ardatzetik ez barreiatzen laguntzen duena.

2. **irudia. Kabitate zilindriko baten erresonantzia modu batzuk.**



Tm010 ***Tm210*** ***Tm310*** ***Tm220***

2.2 Mikrofonien ondoriozko desintonizazioa

Gure ikerketak azken belaunaldiko azeleragailuek gaur egun dituzten arazoetako bat konpontzen du: mikrofonien ondoriozko desintonizazioa. Gaur egungo kabitate erresonanteak

oso eraginkorrak dira eta eremu elektriko oso altuak sortzen dituzte, baina, aldi berean, oso sentikorrak dira perturbazio mekanikoekiko. Izan ere, aurreko atalean azaldu den bezala, kabitateen erresonantzia-maiztasuna haien geometriagatik bakarrik definitzen da. Gaur egungo kabitateak hain dira sentikorrak, non egituran mikrometro gutxi batzuk aldatze hutsak ehundaka hertzeren aldakuntzak sor baititzake haien erresonantzia-maiztasunean [8].

Desintonizazio hori kabitatea funtzionatzen ari den bitartean jasaten dituen perturbazio mekanikoek eragiten dute. Huts-ponpen bibrazioetatik etor daitezke, kabitateak estaltzen dituen helioaren burbuiletatik, eta baita kabitatetik igarotzean partikula-sortak sortutako indar elektromagnetikoetatik ere.

Horrela, kabitatea desintonizatzen denean, jada ez du bere maiztasun nominalean erresonatzen, eta, beraz, injektatzen ari zen irrati-frekuentziako seinalea jada ez da gai eremu elektromagnetikoak eraginkortasunez sortzeko. Horrek esan nahi du energia gehiago kontsumitzen dela eta, kasu batzuetan, azeleragailuak gaizki funtzionatzen duela.

Partikulen azeleragailuetan mikrofonia bidezko desintonizazioa murrizteko hainbat estrategia erabil daitezke. Neurri bat isolamendua eta moteltze mekanikoa dira, azeleragailuaren osagaiei kanpoko bibrazioen transmisioa murrizteko erabil daitezkeenak. Azeleragailuaren osagaietan isolamendu- eta moteltze-gailuak instalatu daitezke, bibrazioa eta perturbazio mekanikoak murrizteko. Esekidura pneumatikoko sistemak edo moteltze aktiboko sistemak oso eraginkorrak izan daitezke helburu horretarako.

Bibrazioak horrela ezabatu ezin diren kasuetarako, kontrol aktiboa izenez ezagutzen den beste neurri bat dago. Berrelikadura-sistemak erabiliz, posible da eremu elektromagnetikoko fluktuazioak neurtzea eta kabitatearen geometria hainbat eragingailuren bidez doitzea. Horri esker, partikula sortaren egonkortasuna mantentzen da, baita kanpoko bibrazioak daudenean ere.

Laburbilduz, partikula-azeleragailuetan mikrofonien ondoriozko desintonizazioa murriztea zeregin kritikoa da partikula-sortaren egonkortasuna eta zehaztasuna bermatzeko. Aurretik aipatutako teknika guztien konbinazioa funtsezkoa da partikula azeleragailuetan mikrofonien ondoriozko desintonizazioa murrizteko eta makinaren funtzionamendu egokia bermatzeko.

3. Ikerketaren muina: MADRC kontrol algoritmoa

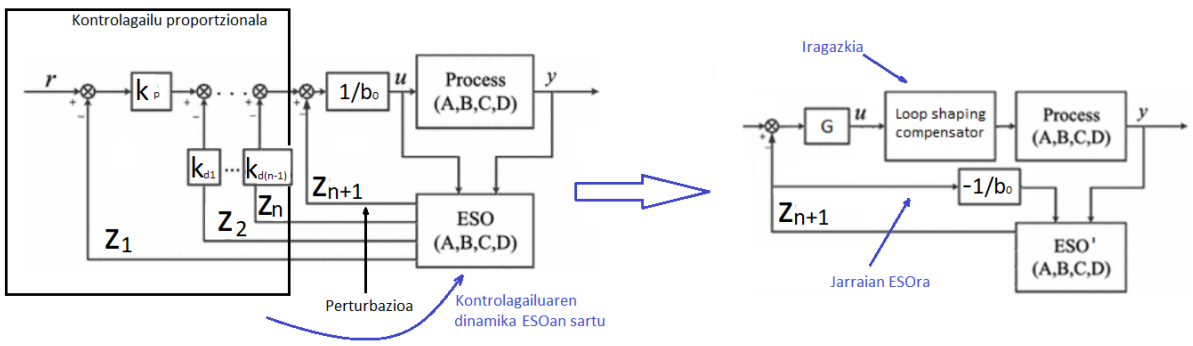
Gure lana mikrofonien kontrol aktiboan zentratzen da, zehazkiago, MADRC algoritmoa erabiliz (ADRCren modifikazio bat). Funtsean, kabitatearen desintonizazioa etengabe kalkulatzen da, uhin islatuak eta erasotzaileak neurtuz. Informazio hori eskuratu ondoren, ADRC algoritmoak desintonizazioa zuzentzeko behar den kontrol-seinalea kalkulatu eta eragingailu piezoelektrikoetara bidaltzen du. Eragingailu horiek barrunbea mekanikoki konprimatzeko edo luzatzeko gai dira, jasaten ari diren perturbazioei aurre egiteko.

Perturbazio aktiboak baztertzeko algoritmoa (ADRC) kontrol aurreratuko teknika bat da, sistema dinamiko ez-linealetarako eta denboran aldakorrak diren sistemetan erabiltzen dena. Perturbazio aktiboen eredu bat erabiltzen du kanpoko perturbazioak denbora errealean zenbatesteko eta ezeztatzeko. Sistema osoa modelatu beharrean, ADRCak kanpoko perturbazioak modelatzen ditu eta sistemaren perturbazio gehigarri gisa tratatzen ditu. Horretarako, egoera hedatutako behatzaile bat (ESO edo *Extended state observer*) erabiltzen du kanpoko perturbazioak neurtzeko eta iragartzeko, eta kontrolatzaile bat perturbazioak konpentsatzeko. Kontrolatzaileak funtzio lineal bat erabiltzen du denbora errealean kontrol-lege bat sortzeko, automatikoki doitzen dena sistemaren baldintzak aldatzen diren heinean [9].

Algoritmoaren errendimendua hainbat sistemaren gainean probatu ondoren, horien artean kabitate supereroale bat, argi geratzen da atzerapenarekiko duen sentikortasun berezia. Kontrol-seinalea gehiegi atzeratzen denean kontrolatu beharreko sistemara iristen, algoritmoa kalkulatzeko abiaduragatik edo eragingailuen dinamikagatik beragatik, sistema desegonkortu

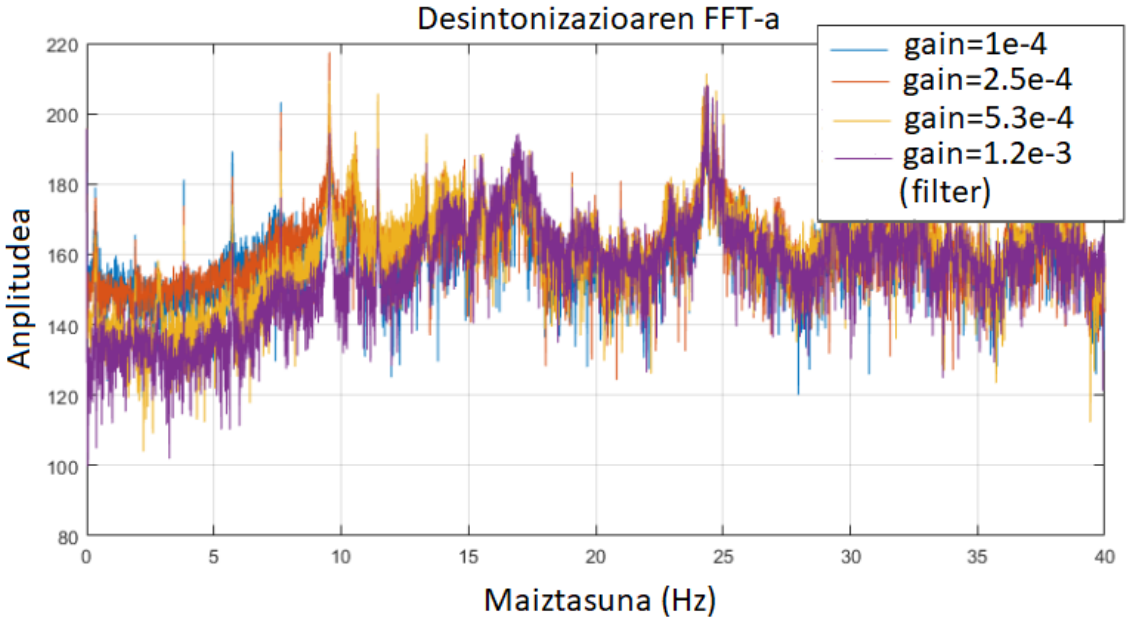
egiten da. Gure ikerketak algoritmoa birdefinitzean zentratzen dira, atzerapenarekiko erresistenteagoa izan dadin

3. irudia. ADRC algoritmotik MADRC algoritmora pasatzeko egin diren aldakuntzak



Alde batetik, kontrolatzaile proportzionala ESO-ko dinamikan bertan barneratzen da. Horrek algoritmoaren diseinu trinkoagoa eta sinpleagoa ahalbidetzen du. Ondoren, perturbazioaren feedback zuzena egiten da ESO-an. Hori posible da perturbazioen kontrolean erreferentzia beti zero delako, eta, beraz, aldaketa horrek ez duelako inola ere aldatzen sistemaren egonkortasun erlatiboa. Azkenik, sistema nahiko ezegonkorra den maiztasun-tarte oro zuzendu ahal izateko, "*Loop shaping*" izeneko iragazki bat sartzen da. Aldaketa horiei esker, sistemaren begizta irekia azter dezakegu, sistema ezegonkortzen duten maiztasunak zein diren jakiteko, eta, ondoren, hainbat iragazkiren bidez zuzendu ahal izateko.

4. irudia. HZBko Tesla kabitatearen desintonizazioa maiztasun eremuan, kontrolagailuaren irabaziaren arabera (gain)



4. irudian, Helmholtz Zentrum Berlinen (HZB) dagoen HobiCat proba-bankuko barrunbe supereroale batean algoritmoa ezartzean lortutako emaitzak ikus daitezke. Esperimentu honetan, hainbat irabazi (3. Irudian agertzen den G-a) aplikatu zitzaizkion kontrolagailuari, errendimendua aztertzeko eta egonkortasun-muga aurkitzeko. Ikus daitekeenez, zenbat eta handiagoa izan irabazia, funtzionamendua orduan eta hobea da, harik eta irabazia 5.3e-4 denean sistema ezegonkortu arte. Sistemaren egonkortasuna hobetzeko eta irabazia handitu ahal izateko, aurrerapen-sare bat (iragazkia) aplikatzen da, eta horren bidez irabazia 1.2e-3 arte igotzeko gai gara, errendimendua hobetuz. Erakusten den Fourierren tranformazioan ikus daitekeenez, kontrolatzailea gai da kabitatearen desintonizazioa 17 Hz-ko banda-zabalera bateraino murrizteko. Modu honetan, 17 Hz-tik behera dauden perturbazioak 20dB-tan

txikitzea lortzen dun. Oraingo helburua kontrolatzailearen banda-zabalera hedatzen saiatzea da, maiztasun altuagoko perturbazioak kontrolatzeko gai izan dadin.

4. Ondorioak

Partikulen azeleragailuak funtsezko makinak dira gizartearentzat, unibertsoaren ulermena irauli dutelako, minbiziaren aurkako tratamenduan lagundu dutelako eta fusio nuklearra bezalako ikerketa zientifikoetarako funtsezko tresnak direlako. Horregatik, oso garrantzitsua da gailu horiek fintzen jarraitzea, gaur egun pairatzen dituzten arazo nagusiei aurre eginez. Horietako bat mikrofonien ondoriozko desintonizazioa da, perturbazio mekanikoen ondoriozko kabitate erresonanteen funtzionamendu okerrari erreferentzia egiten diona. Ikerketa honetan, perturbazio horiek kontrol aktiboko sistema baten bidez kontrolatzea lortu da. Horretarako, lehendik zegoen kontrol-algoritmo bat birdiseinatu da, haren arazo handienetako bat zuzentzeko: atzerapenarekiko sentikortasuna. Horrela, 17 Hz-ko banda-zabalera duten mikrofonien murrizketa lortu da, gaur egun erabiltzen diren kontrolatzaileen errendimendua gainditzuz, hala nola PIDak.

5. Etorkizunerako planteatzen den norabidea

Lehen esan bezala, etorkizunerako lehen helburua egungo kontrolatzailearen banda-zabalera hobetzea da, hainbat iragazki ezarriz. Gainera, Adaptive Feedforward (AFF) kontrol bat gehitzea ere pentsatu da, maiztasun handieneko perturbazio konstanteak kontrolatzeko.

6. Erreferentziak

[1] G. Dvali, “A Lecture on the Hierarchy Problem and Gravity”. CERN, Geneva, Switzerland.

[2] M. J. G. Veltman, "The Higgs Boson", Sci. Am., vol. 289, no. 4, pp. 94-101, Oct. 2003.

[3] Henderson, R. H., Hoppe, B. S., & Nichols, R. C. (2009). Proton therapy for prostate cancer: The initial Loma Linda University experience. International Journal of Radiation Oncology Biology Physics, 74(5), 1371-1376. doi: 10.1016/j.ijrobp.2008.10.079

[4] M. D. Dyce and A. B. Mason, "Particle Accelerators in Mass Spectrometry," in Analytical Chemistry, vol. 54, no. 5, pp. 802-809, Apr. 1982.

[5] R. J. Goldston and A. F. Sontag. (2014). Energy, the Environment, and the National Interest: Fusion Energy and Its Potential Contributions. Annual Review of Environment and Resources, 39(1), 265-296. https://doi.org/10.1146/annurev-environ-031113-144147

[6] Jackson, J. D. (1998). Classical Electrodynamics (3rd ed.). John Wiley & Sons.

[7] S. E. Schwarz, "Resonant Cavities," Springer Science+Business Media, 2014.

[8] A. Grudiev, E. Montesinos, and F. Perez, "Experimental observation of microphonics-induced detuning in superconducting cavities," in Physical Review Special Topics - Accelerators and Beams, vol. 13, no. 9, Sep. 2010.

[9] H. Gao, "An Active Disturbance Rejection Control for Nonlinear Systems," in IEEE Transactions on Automatic Control, vol. 48, no. 2, pp. 361-376, Feb. 2003.

7. Eskerrak eta oharrak

Eskerrak eman nahi dizkiot HZB zentroari egonaldiko 3 hilabeteetan hartu nautelako eta bere instalazioetan esperimentatzen utzi didatelako. Egunero ez da horrelako instalazio zientifiko batean lan egiteko aukerarik izaten, maila handiko zientzialariekin batera.

Azkenik, baina ez garrantzi gutxiagokoa, nire tesi-tutoreei, Josu Jugori eta Pablo Echevarriari, eskerrak eman nahi dizkiet eman didaten laguntza guztiagatik, haiek gabe ikerketa hau ez bailitzateke posible izango. Eskerrik asko guztioi.

Hil bizirauteko: *Pseudomonas aeruginosaren* Tse5 toxinak, poroak sortzen ditu zelula etsaien mintzetan

Amaia González-Magaña[1,2], Jon Altuna[1,2], Carmen Velázquez[1,2], María Queralt-Martín[3], Antonio Alcaraz[3], David Albesa-Jové [1,2,4]
1.Biokimika eta Biologia Molekularra saila (UPV/EHU). 2. Biofisika Institutua (UPV/EHU, CSIC) eta Biofísika Bizkaia Fundazioa. 3. Biofisika Molekularraren Laborategia, Fisika Departamentua, Jaume I Unibertsitatea (Castellon). 4. Ikerbasque, Basque Foundation for Science
amaia.gonzalezm@ehu.eus

Laburpena

Pseudomonas aeruginosa eragin kliniko handiko patogeno oportunista da. Bere birulentzia, hein handi batean, bakterioak dituen jariatze-sistemei zor zaie; horien artean, VI. Motako Sekrezio Sistema (T6SS) oso nabarmena da *P. aeruginosan*. Xiringa moduko nanoaparatu honek, inguruko bakterioen barnean funtzio zelularrak eraso ditzaketen efektoreak jariatzen ditu. Hemen, hurbilketa biofisikoa erabiliz, *P. aeruginosa*k injektatuko Tse5 efektorearen mekanismo toxikoa karakterizatu dugu. Zehazki, Tse5ak bakterioen mintzetan poro ioi-selektiboak sortzeko gaitasuna duela erakusten dugu. Horrela, mikroorganismo lehiakideen mintzak despolarizatzen ditu, zelulen heriotza eraginez.

Gako-hitzak: Bakterio sekrezio sistema; *P.aeruginosa*; toxina poro-eragileak; Tse5 efektorea

Pseudomonas aeruginosa is an opportunistic pathogen of great clinical impact. Its virulence is largely due to the secretion systems possessed by the bacteria, among which the Type 6 Secretion System (T6SS) of P. aeruginosa stands out. This syringe like nanomachine injects effector proteins into competitor bacteria to subvert their key biological functions. Here, we describe the toxic mechanism of P.aeruginosa Tse5 effector, using a biophysical approach. In particular, we show the capacity of Tse5 to form ion-selective pores in bacterial bilayers, which results in membrane depolarisation and bacterial death.

Keywords: bacterial toxins; P.aeruginosa; pore-forming toxins; Tse5 effector

1. Sarrera eta motibazioa

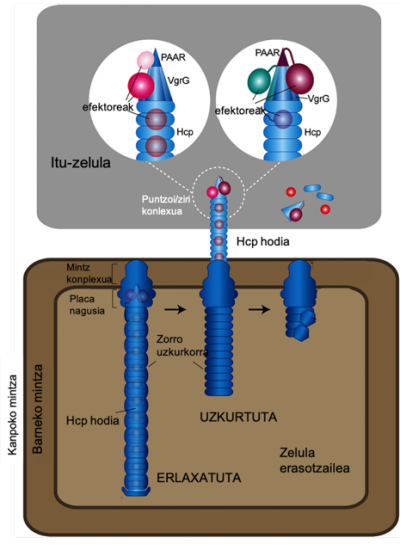
P. aeruginosa bakterio Gram-negatiboa pneumoniaren eragile nagusitakoa da munduan, batez ere, paziente immunodeprimituengan eta biriketako gaixotasunak dituzten pertsonengan. Antibiotikoen aurkako erresistentzia handia duenez, gero eta zailago bihurtzen ari da patogeno honek sortzen dituen infekzioak tratatzea. Horren ondorioz, MOEk (Munduko Osasun Erakundea) *P.aeruginosa*k eragiten dituen infekzioei aurre egiteko tratamendu eta antibiotiko berrien garapenari lehentasuna eman behar diogula ohartarazi du (World Health Organization, 2017).

Bakterio horren patogenotasunaren mekanismo giltzarrietako bat VI. motako jariatze-sistema da (Ingelesez *Type VI Secretion System* edo *T6SS)*, horren bidez, efektoreak jariatzen baititu inguruko bakterio lehiakideen barnean. Beraz, T6SS sistemak egokitasun abantaila ematen du, sekrezio sistema hau duten bakterioen biziraupena sustatzeaz gain, nitxo ekologikoak kolonizatzeko erraztasuna ematen baitie (Bingle et al., 2008; Cianfanelli et al., 2016; Pukatzki et al., 2009). T6SS xiringa baten itxurako nano-gailua da, guztira 14 proteinak osatuta. Bakterioen barnean mihiztatzen da eta kontrakzio prozesu bati esker, efektoreak jariatzen ditu bakterio etsaien barnean. Injekzioa gauzatu ahal izateko sekrezio sistemaren osagaiak konplexu hauetan

antolatzen dira: zorro uzkurkorra, plaka nagusia, mintz-konplexua, barne-hodia eta puntzoi/ziri-konplexua (1.irudia) (Basler, 2015; Brunet et al., 2015; Durand et al., 2015; Kudryashev et al., 2015; Shneider et al., 2013; Zoued et al., 2014). Barne-hodia, Hcp deituriko proteinez osatuta dago (ingelesez *Haemolysin co-regulated* protein izenetik dator). Proteina horien polimerizazioak sortzen duen barne-hodi egituran efektoreak kargatzen dira. Hodiaren goiko partean ziri konplexua dugu, VgrG deituriko proteinen trimero batek osatuta, forma konikoan hartzen duen PAAR sekuentzia bati lotuta egon daitekeena. Punta hori bakterio erasotzailearen eta itu-zelularen mintzak zeharkatzeko lagungarria dela uste da. Hortaz, zorro uzkurkorrak konformazio erlaxatuta eta uzkurtua har dezake, eta, hala, barne tubulua injekta daiteke efektoreekin zein puntzoi konplexuarekin batera, zelula-mintzak zeharkatuz (1.irudia). Toxinak jariatu bezain laster, konplexu osoa desegin egiten da eta ziklo berria hasi daiteke. T6SS efektoreak Hcp hodiaren barruan kapsulatu daitezke edota VgrG-PAAR puntarekin elkar eragin dezakete. Are garrantzitsuagoa , bakterioek efektore bakoitzarekin batera dagokion immunitate-proteina adierazten dute, auto-intoxikaziotik babesteko edo zelula ahizpak ere babesteko (Russell et al., 2012).

P. aeruginosak hiru T6SS talde independente ditu bere genoman (H1, H2 eta H3-T6SS) (Boyer et al., 2009; Filloux et al., 2008). Orain arte ezagutzen diren H1-T6SSen menpeko efektoreek, jarduera anti-prokariotoa dute, hau da, beste bakterioen funtsezko egiturak edo funtzioak kaltetzen dituzte eurak gailentzearren. Azken hamarkadan, aurrerapauso nabariak egin dira T6SSren ezagutzan, baita bakterioen arteko lehian eta birulentzian duen garrantzia ulertzeko. Hala ere, jariatutako toxina gehienen identitateak eta funtzioak ezezagunak dira oraindik. Aipatu bezala, T6SSen mendeko efektoreen funtzio biologiko/molekularra, eta egitura ikertzeak, T6SSak patogenesian eta bakteria lehian duen eginkizuna ulertzen ere lagunduko digu. Gainera, toxina horien egitura, funtzioa eta itu-zelularra deszifratzeak ikuspegi paregabea ematen digu antimikrobiano berriak garatzeko erronkan.

1. irudia. Bakterio Gram-negatiboen VI.Mota Sekrezio Sistemaren (T6SS) irudikapena (Coulthurst et al, 2019)



2. Arloko egoera eta ikerketaren helburuak

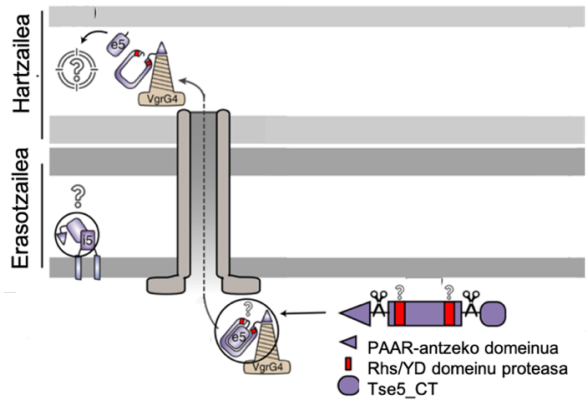
Lan honetan, Tse5 efektorearen (PA2684) (ingelesez *T6SS exported effector Tse5*) funtzio molekularra biofisikoki aztertzea proposatzen dugu. Tse5 *P. aeruginos*eko anduien artean kontserbatuta dagoen H1T6SSen mendeko efektorea da, fibrosi kistiko eta bronkiektasia duten gaixoetatik isolatuta. Bi laborategik aurkitu zuten aldi berean,

2014. urtean, eta *E.coli* bakterioetan toxikoa zela deskribatu zuten (Hachani et al., 2014; Whitney et al., 2014). Dena dela, bere funtzioa, itu-zelularra eta mekanismo molekularra ezezagunak izan dira, gaur arte.

Dirudienez, Tse5ak VgrG4ren puntarekin elkar eragiten du bere PAAR antzeko motiboaren bitartez, H1T6SS bidez jariatuta izateko itu-zeluletan. Gainera, bakterioek Tse5 ekoitzi ahala, Tsi5 (PA2683) immunitate proteina ere adierazten dute, bere burua toxikotasunetik babesteko (Hachani et al., 2014; Whitney et al., 2014). Izan ere, VgrG4, Tse5 eta Tsi5en sekuentziak elkarrekin kodifikatuta agertzen dira beti bakterioaren genoman eta promotore berdinaren menpe daude, hau da, batera adierazten dira . Iragarpen tresna bioinformatikoi esker Tsi5ak bi transmintz domeinu dituela ezagutzeaz gain, *Western-blot* eta lokalizazio azpi-zelularreko esperimentuek Tsei5 mintz zitoplasmatikoan txertatu daitekeela frogatu dute (Hachani et al., 2014; Whitney et al., 2014). Hortaz, Tsei5 mintzeko proteina integrala dela dirudienez, gure hipotesia Tse5ak bere funtzio toxikoa zelula mintzean betetzen duela da, bai zelula mintza iragazkortuz, bai potentziala aldatuz (**2.irudia**).

Tse5en azterketa bioinformatikoak hiru eremu bereizi aurresan ditu. Alde batetik, N-muturrean, proteina jariatzeko beharrezko den garraiorako domeinua (Tse5-NT). Honek, PAAR (Pro-Ala-Ala-Arg) antzeko motiboa du, VgrG4 puntarekin elkar eragiteko. Bestetik, Rhs izeneko (ingelesez *Rearragement hot spot)* erdiko domeinu kontserbatua, YD (Tyr-Asp) sekuentzia errepikapenez osatuta. Azkenik, Tse5en C-muturrean domeinu toxikoa dago (hemendik aurrera Tse5-CT, ingelesez *C-terminal izenetik*), jarduera toxikoa daukana, alegia. Tse5-CTak ez dauka inolako homologiarik ezagutzen diren proteinekin eta itxuraz, beste bi domeinuetatik askatu behar da bere funtzioa bete ahal izateko.

2. irudia. Tse5 efektoreari buruzko ikerketaren egoera. (Whitney et al., 2014)-tik moldatuta



Esan bezala, Tse5ak bere funtzio toxikoa mintzean betetzen duela berresteko eta bere funtzioa aztertzeko, hona hemen ikerketaren helburuak:

1. Tse5-CTren purifikatzea, ikerketa biofisikoak egin ahal izateko.
2. Tse5-CTak bakterio Gram-negatiboen mintzetan sartzeko joera aztertzea. Horretarako monogeruza lipidiko batean txertatzeko gaitasuna neurtuko da monogeruza esperimentuekin.
3. Tse5-CT toxina poro eragilea den ikertzea , elektrofisiologia esperimentuen bitartez.

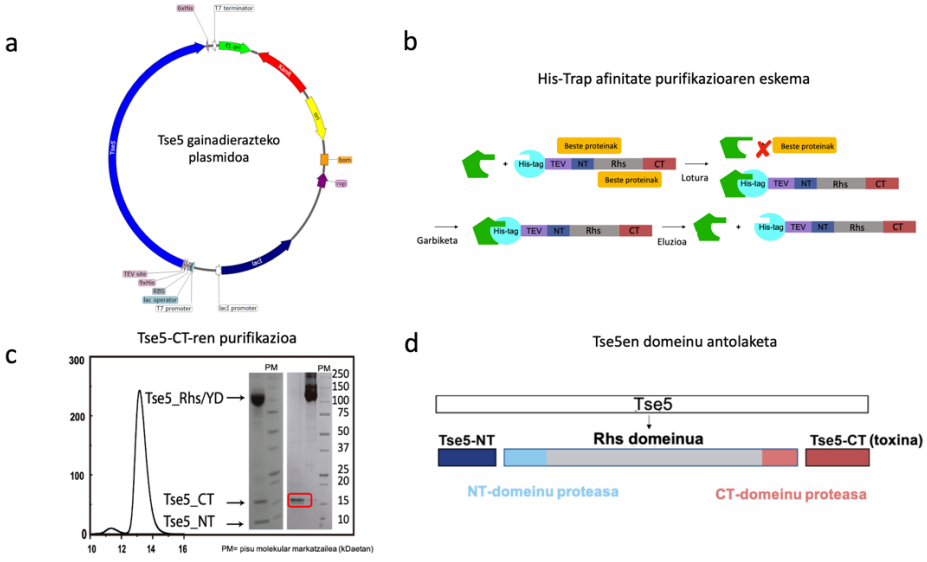
3. Ikerketaren muina

3.1 Tse5-CTren purifikazioa

Lehendabizi, Tse5-CT funtzio eta itu-zelularra aztertzeko, Tse5-CT proteina purua ekoiztu behar dugu. Tse5-CT hidrofobikoa denez, metodo arrunten bidez purifikatzea oso zaila da. Beraz, 146 kDa-eko Tse5 efektore osoa gainadierazi eta purifikatzea, eta hortik Tse5-CT peptidoa ateratzea erabaki dugu. Tse5 adierazteko, *Escherichia coli* Lemo21(DE3) zelula konpetenteak transformatu dira Tse5 proteinaren sekuentzia genetikoa duen plasmido batekin eta beharrezko antibiotikoak nahiz erramnosa duten LB plaketan erein dira. 3.a irudian plasmidoaren eskema ikusi daitekeenez, Tse5aren adierazpena T7 promotorearen menpe dago eta sekuentziaren aurrean histidina isatsa dauka, purifikazioa errazteko (**3.a irudia**). Isatsa moztu behar izanez gero, TEV sekuentzia ere gehitu da, TEV proteasak ezagutu eta moztu dezakeena. Gainera, kanamizina antibiotikoaren aurkako erresistentzia ematen dion genea ere badauka, plasmidoa barneratu duten bakteriak bakarrik hautatu ahal izateko. Lemo21(DE3) zelula konpetenteak erramnosarekin erregulatzen den plasmido gehigarria duten zelulak dira eta T7 promotorearen menpe dauden plasmidoen geneen adierazpena inhibitzeko gaitasuna daukate (Schlegel et al., 2012). Gure proteina toxikoa denez, bere adierazpen basala murrizteko ezin hobea da sistema hau. Proteinaren gainadierazpena sustatzeko, bakteriak kanamizina eta kloranfenikol antibiotikoak dituen LB kultibo-medioan hazten jarri dira 37ºCtan eta dentsitate optiko $(DO)_{600}$= 0.8 balioetara heltzean, IPTG (ingelesez *isopropyl ß-D-1-thiogalactopyranoside*) induktorea gehitu zaie. Ondoren, kultiboen tenperatura 18ºC-ra jaitsi eta 18 ordu inkubatzen utzi dira.

Zelulen lisiaren ostean, Tse5 frakzio disolbagarritik purifikatu da kromatografia sistema (ÄKTA FPLC; GE Healthcare) erabiliz eta gure proteina disoluzio indargetzailean edukiz. Lehenengo afinitate kromatografia urrats bat egin da (HisTrap HP zutabe batekin). Histidina isatsa zutabera itsatsiko da eta gainerako ezpurutasunetatik bananduko du gure intereseko proteina . Ondoren, gel iragazpenezko kromatografia (HiLoad Superdex 200 26/600 pg) egiten da (tamainaren arabera banatzen du), gainontzeko ezpurutasunak eta batez ere, oligomeroak kentzeko. **3.c irudian** ikus daitekeenez, gel iragazpenaren piko simetrikoak proteina purua dagoela adierazten digu. *SDS-PAGE*-ko gelean, aldiz, hiru zati bereiz daiteke, Tse5 proteinaren auto-ebakuntzaren ondorioz sortutakoak. Hiru zati hauek iragarritako 3 domeinuei dagokie: N-muturreko eremua (8 KDa), Rhs erdiko eremua (125kDa) eta Tse5-CT domeinu toxikoa (15 kDa) **(3d. irudia).**

3. irudia. a.Tse5 plasmidoren eskema b. HisTrap afin itate purifikazioaren eskema. c. Tse5-CT-ren purifikazioaren SDS d. Tse5 hiru domeinuz osatutako polipeptidoa da.



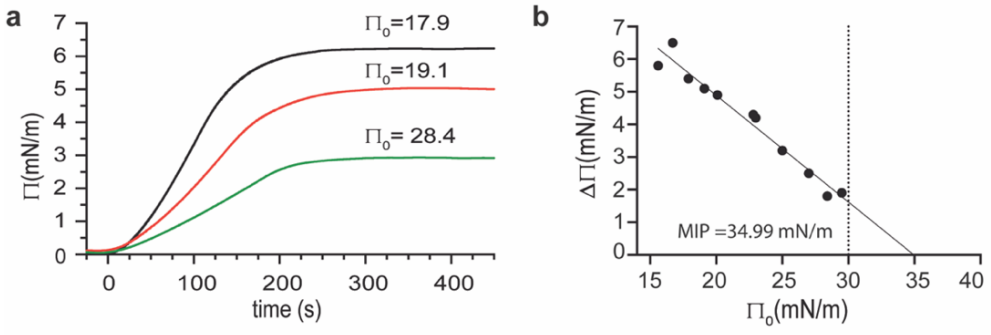
Lehenik, Tse5-CT beste bi zatietatik banandu ahal izateko 8M urean desnaturalizatu behar da Tse5 proteina purua. Ondoren, N-muturreko domeinua kentzeko, desnaturalizatutako proteina disoluzioa nikel erretxinarekin inkubatzen da (histidina isatsa duenez, itsatsita gelditu ko da

erretxinara eta beste bi peptidoak, aldiz, ez). Nahasketa zentrifugatu eta gero, erretxinatik banatzen dugu gainjalkina, Tse5-CT eta Rhs zatiekin. Azkenik, Rhs eta Tse5-CT peptidoak, amonio sulfatozko hauspeatze diferentziala eginez banatzen dira (Wingfield, 2016), 0.9 M eta 3M amonio sulfatorekin, hurrenez hurren. Behin Tse5-CT purifikatuta eta ur ultra puruarekin (MiliQ) zenbait garbiketa ziklo egin ostean (gatz hondakinak kentzeko), proteina liofilizatu eta konposatu organiko batean disolbatzen da. **3. irudiaren** eskuineko SDS-PAGE gelean, Tse5-CT proteina purua behatu daiteke.

3.2 Tse5-CT bakterio Gram-negatiboen mintz biologikoetan espontaneoki sar daiteke

Behin Tse5-CT proteina purifikatuta, monogeruza batean espontaneoki txertatzeko duen gaitasuna aztertu dugu, *Langmuir-Blodgett* teknika erabiliz (Maget-Dana, 1999; Pockels, 1926). Monogeruza prestatzeko, *E.coli* estraktu lipidikoa erabili dugu eta purifikatutako peptidoa gehitu ondoren, alboko presioaren aldaketa neurtu dugu. **4a irudian** Tse5-CT gehitzean albo presioaren igoera ikus daiteke denboran zehar, hasierako hainbat presioetatik abiatuz. Ohikoa denez, hasierako albo-presioa hazi ahala, peptidoaren txertaketa murriztu egiten da, albo presio kritiko batera heldu arte (Πc). Izan ere, presioa altua denean, geruza oso paketatua dago eta ezin da ezer gehiago sartu. **4.b irudian**, grafikoaren puntuak esperimentu independenteei dagozkie (n=11). Zuzenaren erregresio linealak ($y = -0.3258x + 11.401$), txertaketa presio maximoaren edo MIP (ingelesez *Maximal insertion pressure*) balioa kalkulatzea ahalbidetu digu, 34.99mN/m-koa, hain zuzen. Kontuan hartu behar da, mintz biologikoen kanpoko monogeruzaren lipidoen antolaketa 30/mN/m eta 35 mN/m bitarteko alboko azaleko presioetara hurbiltzen dela (**4b grafikoa**, puntu etenez adierazita) (Calvez et al., 2009; Demel et al., 1975). Hala bada, gure proteina gehitzean, alboko presioa kritikoa tarte horretako balioetan mugitzen bada mintz biologikoetan txertatzeko gai ohi dela esan nahi du. Datu horien arabera, Tse5 mintz biologikoetan espontaneoki txertatzeko gaitasuna daukala ondoriozta dezakegu.

4. irudia. Tse5-CT monogeruzetan txertatzeko gaitasun neurtzen da Langmuir-Blodgett esperimentuen bitartez.

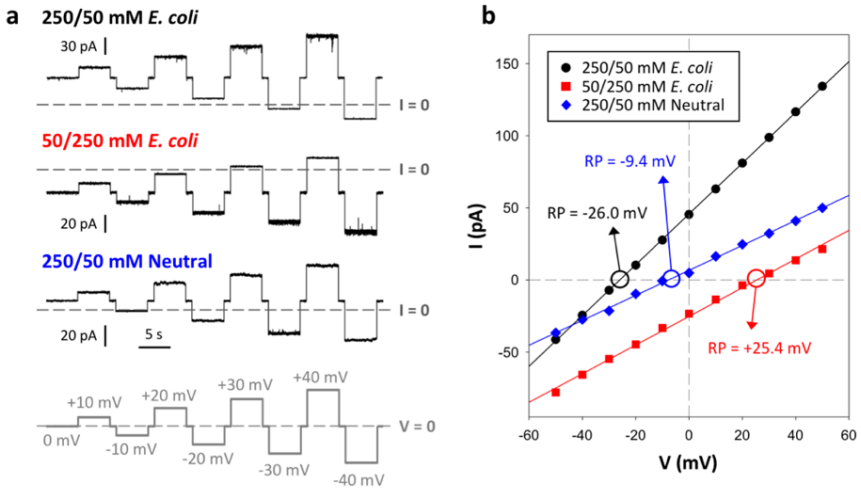


3.3 Tse5ek intoxikatutako bakterioen mintzetan poro ioi-selektiboak sor ditzake

Ondoren, elektrofisiologia esperimentuak egitea erabaki dugu, Tse5-CTek mintzean zehar ioiak garraiatzeko pororik sor dezakeen aztertzeko. Bi-geruza lauak eratzeko Montal-Mueller teknikan oinarritu gara (Montal & Mueller, 1972). Horretarako, bi monogeruza prestatu dira bi konpartimentuzko (*cis* eta *trans)* tefloizko zelda batean eta lipidoa gehitu da. Konpartimentuak 100 µm inguruko zulo bat duen tefloi film batez banatzen dira eta disoluzio indargetzailez betetzen dira. Modu horretan, disoluzioen maila zuloaren gainetik igotzean, mintz laua bi-geruzen aposiziotik sortzen da. Liofilizatutako Tse5-CT DMSO (ingelesez *dimethyl sulfoxide*) konposatu organikoan disolbatu ondoren, bi-geruza lauko sistemaren *cis* aldean gehitu, boltajea ezarri eta korronteak neurtu ditugu. Saiakerak egiteko *E.coli* estraktu lipidiko polarra erabili da (bakterio Gram-negatiboen eredu moduan, batez ere, karga negatibozko lipidoz osatuta) eta kontrolak egiteko, aldiz, DOPE (ingelesez *1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine*) lipido neutroa.

Korronteak 5mM Hepes pH 7,4 soluzio indargetzailean eta baldintza asimetrikoetan neurtu dira, mintzaren egoera imitatzeko (bakteria Gram-negatiboen zitoplasmak eta periplasmak konposizio kimiko desberdina baitute). Beraz, gatz konzentrazio asimetrikoa ezarriz egin dira esperimentuak; hau da, 250 mM KCl *cis*/50 mM KCl *trans* (**5a irudia,** 250/50 mM) edo 50 mM KCl *cis*/250 mM KCl *trans* (**5a irudia**, 50/250 mM) erabiliz. Kasu guztietan, Tse5 aldean gehitu ostean, espontaneoki txertatzen da mintzean, korronte aski egonkorrak sortuz (**5.a irudia)**. **5b grafikoan**, zenbait esperimentu adierazgarrien korrontea eta ezarritako boltajearen (I – V) erlazioa erakusten da. Korronte horiek joera ohmikoa dutela erakusten digu, hau, da, kanalaren konduktantzia (G= I/V) ez da aldatzen aplikatutako tentsioaren magnitudearekin eta polaritatearekin. Gainera, proteina beti *cis* aldean gehitzen da, beraz gradientearen norabideak Tse5-aren txertatzeko gaitasunean ez duela eraginik izaten erakusten digu. Horrez gain, esperimentu hauek ioi-selektibitatea aztertzea ere ahalbidetzen digute. Selektibitatea kuantifikatzeko RP (ingelesez *reversal potential*) parametroa kalkulatzen da, hau da, ezarri beharreko boltajea korrontea 0 izateko mintz gradiente baldintzetan (Ovchinnikov, 1981). Anioien eta katioien mugikortasuna berdina denez KCl-ren kasuan, boltajea aplikatu barik agertzen den korronteak (**5.b irudiko** I–V kurbaren intertzeptatze bertikala), poroaren selektibitatea ere adierazten digu. Kalkulatutako RP balioak negatiboak dira baldintza guztietan, Tse5-ek eragindako poroak nolabaiteko katioi selektibitatea dutela erakutsiz. Are gehiago, lipido neutroen esperimentuetan selektibitatea baxuagoa denez, Tse5 poroen sorreran parte hartzen duela frogatzen du (eta ez lipidoak bakarrik).

5.irudia. Elektrofisiologia esperimentuak Tse5 toxinarekin.



4. Ondorioak

Lan honek *P. aeruginosak* jariatzen duen Tse5 efektorearen funtzio toxikoa hobeto ulertzen lagundu digu, oro har. Proteina gainadieraztea eta purifikatzea lortzeaz gain, itu-zelulen mintzean txertatzeko eta katioiak garraiatzeko joera duten poroak sortzen dituela ikusi dugu. Izan ere, gure emaitzek, Tse5ak itu-zelulak despolarizatzeko gaitasuna erakusten zuten zitometria esperimentuekin bat egiten dute (González-Magaña et al., 2022). Neurtutako ioi-garraioa Tse5-Cek intoxikatutako zelula lehiakideak despolarizatzeko duen mekanismo molekularra dela ondorioztatu dezakegu. Jakina denez, bakterio Gram-negatiboen zitoplasmak periplasmak baino karga negatiboagoa dauka eta despolarizazioa barneko karga negatibo horren galera baino ez da. Zer esanik ez, mintzaren potentzial aldaketa zelularen funtsezko funtzioetan eragin dezake eta zelulen heriotza gauzatu (Benarroch & Asally, 2020).

Horretaz gain, Tse5 proteina purifikatzean hiru zatitan banatuta dagoela ikusi ahal izan dugu. Antza denez, Rhs erdiko domeinuak, beste toxina batzuetan agertzen diren bi eremu kontserbatu

ditu bere bi muturretan, eta Tse5-NT eta CT peptidoak askatzeko ezinbestekoak direla dirudi. Hala ere, ebakuntza puntua kontserbatuta egon arren, hondar katalitikoak ez dira oraindik aurkitu.

5. Etorkizunerako planteatzen den norabidea

Etorkizunean, aipatutako domeinu proteolitikoak bermatzea eta N- zein C- muturrak askatzearen arduradunak diren hondar katalitikoak identifikatzea gustatuko litzaiguke. Horrek N- zein C-domeinuen toxikotasunean duten garrantzia eta euren funtzio espezifikoak ulertzen lagunduko digu. Horretaz gain, Tse5-aren egitura atomikoa ebazteko asmoa dugu, bere mekanismo molekularrean sakontzeko eta sortzen dituen poroen antolamendua ulertzeko oso baliagarria izango delako.

Mintzaren potentzialak funtsezko funtzio zelular ugari erregulatzen ditu, besteak beste, pH-homoeostasia, garraioa, higikortasuna, antibiotikoekiko erresistentzia, zelulen zatiketa, komunikazio elektrikoa eta abar. Horrela, ba, mintzaren despolarizazioa estrategia oso eraginkorra da beste mikroorganismoekin lehiatzeko eta biziraupena bermatzeko ingurune polimikrobianoetan (Benarroch & Asally, 2020).Argi dago, Tse5ren ikerketa, etorkizunean antibiotiko berrien garapenerako oso baliagarria izan dakigukeela.

6. Erreferentziak

Basler, M. (2015). Type VI secretion system: Secretion by a contractile nanomachine. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, *370*(1679). https://doi.org/10.1098/rstb.2015.0021

Benarroch, J. M., & Asally, M. (2020). The Microbiologist's Guide to Membrane Potential Dynamics. *Trends in Microbiology*, *28*(4), 304–314. https://doi.org/10.1016/J.TIM.2019.12.008

Bingle, L. E., Bailey, C. M., & Pallen, M. J. (2008). Type VI secretion: a beginner's guide. In *Current Opinion in Microbiology* (Vol. 11, Issue 1, pp. 3–8). https://doi.org/10.1016/j.mib.2008.01.006

Boyer, F., Fichant, G., Berthod, J., Vandenbrouck, Y., & Attree, I. (2009). Dissecting the bacterial type VI secretion system by a genome wide in silico analysis: what can be learned from available microbial genomic resources? *BMC Genomics*, *10*(1), 104. https://doi.org/10.1186/1471-2164-10-104

Brunet, Y. R., Zoued, A., Boyer, F., Douzi, B., & Cascales, E. (2015). The Type VI Secretion TssEFGK-VgrG Phage-Like Baseplate Is Recruited to the TssJLM Membrane Complex via Multiple Contacts and Serves As Assembly Platform for Tail Tube/Sheath Polymerization. *PLoS Genetics*, *11*(10). https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005545

Calvez, P., Bussières, S., Éric Demers, & Salesse, C. (2009). Parameters modulating the maximum insertion pressure of proteins and peptides in lipid monolayers. *Biochimie*, *91*(6), 718–733. https://doi.org/10.1016/j.biochi.2009.03.018

Cianfanelli, F. R., Monlezun, L., & Coulthurst, S. J. (2016). Aim, Load, Fire: The Type VI Secretion System, a Bacterial Nanoweapon. In *Trends in Microbiology* (Vol. 24, Issue 1). https://doi.org/10.1016/j.tim.2015.10.005

Coulthurst, S. (2019). The Type VI secretion system: A versatile bacterial weapon. *Microbiology (United Kingdom)*, *165*(5), 503–515. https://doi.org/10.1099/mic.0.000789

Demel, R. A., Geurts van Kessel, W. S. M., Zwaal, R. F. A., Roelofsen, B., & van Deenen, L. L. M. (1975). Relation between various phospholipase actions on human red cell membranes and the interfacial phospholipid pressure in monolayers. *BBA - Biomembranes*, *406*(1), 97–107. https://doi.org/10.1016/0005-2736(75)90045-0

Durand, E., Nguyen, V. S., Zoued, A., Logger, L., Péhau-Arnaudet, G., Aschtgen, M. S., Spinelli, S., Desmyter, A., Bardiaux, B., Dujeancourt, A., Roussel, A., Cambillau, C., Cascales, E., & Fronzes, R. (2015). Biogenesis and structure of a type VI secretion membrane core complex. *Nature*, *523*(7562), 555–560. https://doi.org/10.1038/nature14667

Filloux, A., Hachani, A., & Bleves, S. (2008). The bacterial type VI secretion machine: yet another player for protein transport across membranes. *Microbiology*, *154*(6), 1570–1583. https://doi.org/10.1099/mic.0.2008/016840-0

González-Magaña, A., Altuna, J., Queralt-Martín, M., Largo, E., Velázquez, C., Montánchez, I., Bernal, P., Alcaraz, A., & Albesa-Jové, D. (2022). The P. aeruginosa effector Tse5 forms membrane pores

disrupting the membrane potential of intoxicated bacteria. *Communications Biology*, *5*(1), 1189. https://doi.org/10.1038/s42003-022-04140-y

Hachani, A., Allsopp, L. P., Oduko, Y., & Filloux, A. (2014). The VgrG Proteins Are "à la Carte" Delivery Systems forBacterial Type VI Effectors. *Journal of Biological Chemistry*, *289*(25), 17872–17884. https://doi.org/10.1074/jbc.M114.563429

Kudryashev, M., Wang, R. Y. R., Brackmann, M., Scherer, S., Maier, T., Baker, D., Dimaio, F., Stahlberg, H., Egelman, E. H., & Basler, M. (2015). Structure of the Type VI secretion system contractile sheath. *Cell*, *160*(5), 952–962. https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.01.037

Maget-Dana, R. (1999). The monolayer technique: a potent tool for studying the interfacial properties of antimicrobial and membrane-lytic peptides and their interactions with lipid membranes. In *Cyaan Magenta Geel Zwart Biochimica et Biophysica Acta* (Vol. 77747). www.elsevier.com/locate/bba

Montal, M., & Mueller, P. (1972). *Formation of Bimolecular Membranes from Lipid Monolayers and a Study of Their Electrical Properties* (Vol. 69, Issue 12).

Ovchinnikov, Y. A. (1981). Ion Channels of Excitable Membranes. In *Science and Scientists: Vol. Third Edit* (Third Ed., pp. 235–241). Sinauer Associates Inc. https://doi.org/10.1007/978-94-009-7755-6_30

Pockels, A. (1926). The Measurement of Surface Tension with the Balance. *Science*, *64*(1656), 304. https://doi.org/10.1126/science.64.1656.304.a

Pukatzki, S., McAuley, S., & Miyata, S. (2009). The type VI secretion system: translocation of effectors and effector-domains. *Current Opinion In Microbiology*.

Russell, A. B., Singh, P., Brittnacher, M., Bui, N. K., Hood, R. D., Carl, M. A., Agnello, D. M., Schwarz, S., Goodlett, D. R., Vollmer, W., & Mougous, J. D. (2012). A widespread bacterial type VI secretion effector superfamily identified using a heuristic approach. *Cell Host and Microbe*, *11*(5), 538–549. https://doi.org/10.1016/j.chom.2012.04.007

Schlegel, S., Löfblom, J., Lee, C., Hjelm, A., Klepsch, M., Strous, M., Drew, D., Slotboom, D. J., & de Gier, J. W. (2012). Optimizing membrane protein overexpression in the Escherichia coli strain Lemo21(DE3). *Journal of Molecular Biology*, *423*(4), 648–659. https://doi.org/10.1016/j.jmb.2012.07.019

Shneider, M. M., Buth, S. A., Ho, B. T., Basler, M., Mekalanos, J. J., & Leiman, P. G. (2013). PAAR-repeat proteins sharpen and diversify the type VI secretion system spike. *Nature*, *500*(7462), 350–353. https://doi.org/10.1038/nature12453

Whitney, J. C., Beck, C. M., Goo, Y. A., Russell, A. B., Harding, B. N., de Leon, J. A., Cunningham, D. A., Tran, B. Q., Low, D. A., Goodlett, D. R., Hayes, C. S., & Mougous, J. D. (2014). Genetically distinct pathways guide effector export through the type VI secretion system. *Molecular Microbiology*, *92*(3), 529–542. https://doi.org/10.1111/mmi.12571

Wingfield, P. T. (2016). *Protein Precipitation Using Ammonium Sulfate*. 1–10. https://doi.org/10.1002/0471140864.psa03fs13.Protein

World Health Organization. (2017). Prioritization of pathogens to guide discovery, research and development of new antibiotics for drug resistant bacterial infections, including tuberculosis. In *WHO reference number: WHO/EMP/IAU/2017.12*.

Zoued, A., Brunet, Y. R., Durand, E., Aschtgen, M. S., Logger, L., Douzi, B., Journet, L., Cambillau, C., & Cascales, E. (2014). Architecture and assembly of the Type VI secretion system. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, *1843*(8), 1664–1673. https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2014.03.018

7. Eskerrak eta oharrak

Artikulu hau Amaia Gonzáñez Magañari esleitutako Margarita Salas diru-laguntzari esker (Unibertsitate Sistema Espainiarra Birkualifikatzeko laguntzen deialdia 2021-2023, EUROPAR BATASUNAK-NEXT GENERATION EU-K FINANTZATUTA) eta David Albesa-Jovek jasotako Espainiako Ekonomia eta Lehiakortasun Ministerioko CTQ2016-76941-R, Eusko Jaurlaritzako IT709-13 eta BBVA Fundazioaren IT1745-22 proiektuei esker idatzi da.

Eskerrak eman nahi dizkiot Jon Altunari lan honen alderdi esperimentalean nahiz artikuluaren garapenean egindako lanagatik; María Queralteri eta Antonio Alcarazi, bere laguntza ezinbestekoa izan delako elektrofisiologia esperimentuak egiteko, baita datuak aztertu zein aurkezteko. David Albesa-Joveri, ideia planteatu eta proiektua zuzentzeagatik; Azkenik, eskerrak eman nahi nizkion Biofisika Institutuari eta Jaume I Unibertsitateari esperimentuak egiteko beharrezko espazioa eta baliabideak eskaintzeagatik.

Artikulu hau "González-Magaña et al., 2022" nazioarteko artikulutik eratorri da.

Cantor entropia altuko aleazioaren emisibitate infragorriaren eta egoera mikroestrukturalaren azterketa

Mikel Ballarena Tellechea[1], Jon Gabirondo López[1], Iñaki López Ferreño[3], Telmo Echániz[2], Raquel Fuente[2], Boris Straumal[4], Gabriel A. López[1]

[1] Fisika Saila. UPV/EHU. Sarriena auzoa z/g, E-48940 Leioa
[2] Matematika Aplikatua Saila. UPV/EHU. Ingeniero Torres Quevedo enparantza 1, E-48013 Bilbo
[3] Matematika Aplikatua Saila. UPV/EHU. Nieves Cano kalea 12, E-01006 Gasteiz
[4] Osipyan Institute of Solid State Physics, Russian Academy of Sciences Moscow District, Academician Ossipyan Str., Chernogolovka, 142432, Russian Federation

inaki.lopez@ehu.eus

Laburpena

Entropia altuko aleazioak azken hamarkadan ikerkuntzan hauen propietate bikainak direla eta interes handia hartu duten materialak dira. Propietate termo-optikoen ezagutza ezinbestekoa da material berrien garapenerako, aldiz oraindik ez da aleazio berri hauen horrelako neurketarik egin. Lan honetan Cantor aleazioaren azterketa mikroestruktruala egin da alde batetik eta norabidezko emisibitate espektralen neurketa espektro infragorrian bestetik. Honen bidez ikusi da aleazio honen testura kristalografikoak ez duela eraginik emisibitate balioetan.

Hitz gakoak: Entropia altuko aleazioak, Cantor aleazioa, emisibitatea, termografia

Abstract

In the last decade, high entropy alloys have attracted much attention due to their excellent properties. The knowledge of thermooptic properties is essential for the development of new material, even though there has been no meassurement of this kind yet. In this work, Cantor alloy's microstructural analysis and directional spectral emissivity meassurements on the infrared range have been performed. By this the lack of relationship between crystalographic texture and and emissivity values has been observed.

Keywords: *High entropy alloy, Cantor alloy, emissivity, thermography*

1 Sarrera eta motibazioa

Entropia altuko aleazioak (HEA) lehenengoz Cantor et al. eta Yeh et al. autoreek (2004) aldi berean proposatutako aleazio teknika berria da zeinaren arabera bost elementu edo gehiagoren nahasketa ekimolar zein kuasi-ekimolarra egiten den, $\%5 - \%35$ arteko kontzentrazio atomikoetan. Aleazio teknika tradizionalaren intuizioaren kontra doan teknika da horrela: estrategia konbentzionala osagai nagusi batean zentratzen da, hori izanik materialaren propietate nagusiak definitzen dituena eta aleazio elementuek propietate sekundarioak eskeintzen dituzte (Yeh et al., 2004).

HEAen entropia izena aipatzeak aleazio hauetan berezkoak diren 4 efektu zentraletako bati egiten dio erreferentzia. Hauek hain zuzen entropia altuaren efektua, difusio motelaren efektua, izugarrizko sare distortsioa eta koktel efektuak dira (Chen et al., 2018). Lehenengoaren arabera, ausazko soluzio solido eta konposatu intermetalikoen entropia konfigurazionala $1.61R$, non R gasen konstantea den, eta zero dira hurrenez hurren. Gibbs-en energia askearen formula gogoratuz gero, $G = H - TS$ (non G Gibbs-en energia askea, H entalpia, T tenperatura eta S entropia diren), entropia altuagoko faseek aleazioetan Gibbs-en energia baxuagoa dute, eta ondorioz HEAetan zorizko soluzio solidoen formazioa dago hobesturik potentzialki kaltegarriak izan daitezken intermetalikoen formazioa baino. Bigarrenari esker HEAek hainbat onura lortzen dituzte, hala nola soluzio solido asetuen egonkortasun eta mantentzea, berkristalizazio tenperaturaren igoera, granoen handipenaren abiadura txikitzea eta honen ondoriozko granoen egonkortasun morfologikoa batzuk aipatzearren. HEAk definizioz tamaina desberdine-

ko elementu anitzez daude osaturik eta ondorioz sare kristalinoa deformatu egiten da, eta deformazio hau HEAen erresistentzia eta gogortasun handien arrazoia da. Bukatzeko, koktel efektua aleazioen diseinuan da interesgarria bereziki, honek bukaerako materiala sortzeko erabili ditugun elementuen izaeraren araberakoa dela gogorarazten baitu. Tenperatura altuetako errendimendu onak bilatzen badira elementu errefraktarioen erabilera gomendagarria da, dentsitate baxuko aleazioa nahi izanez gero dentsitate baxuko aleazioetaz abiatu beharko litzateke etab. Gainera, propietateak nahasketen araberakoak izateaz gain, sare kristalinoko elementuen arteko interakzioen araberakoa da, ondorioz jatorrizko elementuen propietateen hobekuntza ahalbidetuz.

HEAen espazio konposizionala handia denez, anitz dira probaturiko elementu konbinaketak, horien artean bat edo beste diferentziatuz. Horietako bati, CoCrFeMnNi fcc fase bakarraz osatuta dagoen eta ekimolarra den aleazioari *Cantor* aleazioa deritzo. Konfigurazio sinple hau bere propietate termo-mekanikoak direla eta oinarrizko ikerketarako aproposa bilakatzen da (Eissmann et al., 2021). Horrelako aleazio berri bat garatzean, ezinbestekoa da haren ezaugarri fisikoak neurtu eta aztertzea, horiek finkatuko baitituzte materialaren erabilerak eta ekoiztean erabili beharreko teknikak. Zientziaren eta industriaren ikuspuntutik, oso garrantzitsua den ezaugarria da emisibitatea, gainazal batek erradiazio elektromagnetikoa igortzeko duen gaitasuna zenbatzen duena. Ezaugarri erlatiboa da, aztertutako gainazalak igorritako argiaren eta igorle perfektu batek, gorputz beltz batek, sortuko lukeen erradiazioaren arteko zatidura bezala definitzen baita (Howell et al., 2020). Ondorioz, 0 eta 1 bitarteko balioak bakarrik har ditzake. Emisibitate infragorriak berebiziko garrantzia du tenperatura altuetan edota hutsean gertatutako erradiazio bidezko bero-trukeak aztertzeko ezinbesteko parametroa baita. Gainazal baten emisibitatea tenperaturarekin, behatze-angeluarekin eta uhin-luzerarekin aldatzen da, eta dependentzia azaltzen du ere gainazalaren zimurtasuna eta kontaminazioekiko.

2 Arloko egoera eta ikerketaren helburuak

Bibliografian entropia altuko aleazioen emisibitate neurketarik aurkitzea ez da posible oraindik, horien inguruko ikerketak konposizio-mikroegitura-propietate arteko erlazioak bilatzen saiatzen baitira (Miracle eta Senkov, 2017). Harritzekoa da beraz, mikroegitura materialen historial termo-mekanikoaren menpeko izanik hau kontrolatzen laguntzen ahal duen propietatearen neurketarik ez izatea. Lan honen helburua bikoitza izango da beraz: Cantor aleazioaren emisibitate neurketak egingo dira lehenengoz eta bide batez, emisibitate-esperimentua egitean egindako tratamendu termikoak laginaren mikroegituran eta testuran duen eragina aztertuko da, emisibitatearen eta mikroegituraren arteko erlazioa lortzen saiatuz.

3 Ikerketaren muina

3.1 Materialak eta metodoak

Lanean erabilitako lagina forma zilindrikoko 17.5 mm-ko diametroko eta 2 mm-ko altuerako Cantor aleazioa izan da. Lebitazio bidezko indukzio labean galdatu da lagina, Argoi puruzko ingurunean, eta azkar hoztua izan da ondoren inongo tratamendu termikorik aplikatu gabe. Gainera alde lauak moztu, lixatu eta leunduak izan dira azken ukitua 0.05 μm-ko alumina soluzioaren bidez. Konposizio aldetik lehen aipatutako 5 elementuez gain titanioa ere gehitu zaio aleazioari, baina proportzio oso txiki batean ($< \%0.1$ at.).

Metodologiari dagokionez, hasteko laginaren mikroegitura aztertu da laginaren jatorrizko egoeraren berri izateko, emisibitatearen neurketak aurrera eramatean egindako beroketa-prozesuak eragina izan baitezake. Jarraian emisibitatea neurtu da lagina 400 °C-ra arte berotuz eta, amaitzeko, mikroegitura aztertu da berriro.

Mikroegituraren karakterizazioa egiteko X-izpien difrakzio (XDR) eta ekortze mikroskopia elektroniko (SEM) teknikak erabili ditugu, horrelako ikerlanak egitean ohikoa den bezala.

Laginen fase kristalino desberdinak analizatu eta bereizteko erabili ohi den teknika da X-izpien difrakzioa (XRD), bai eta lagin baten testura kristalografikoaren edo tentsio hondarren analisiak egiteko ere (Larrañaga Varga, 2020). Teknikaren oinarria X-izpi sorta batek lagin bat erasotzean sortutako islapen desberdinak aztertzean datza. Erabilitako metodo bat hauts X-izpi difrakzioa da zeinetan lagin finko batek sorturiko Debye-ren eraztunen intentsitatea neurtzen den islapen angeluarekiko (2θ angelua), laginaren fase identifikazio azkarra lortuz. Beste metodoa aldiz testura, kristaltxoen orientazioen distribuzioa, neurtzea ahalbidetzen duena da, non aurretiaz hauts XRD-rekin identifikaturiko islapenen anisotropiak neurtzen diren (Wagner, 1999). Bi neurketa motak egitea ahalbidetzen duen gailua erabiliko da horretarako, Euskal Herriko Unibertsitateko Ikerkuntzarako Zerbitzu Orokorretako (SGIker) "lagin kristalinoko XRD" zerbitzuaren *Bruker D8 Discover* X-izpien difraktometroa.

SEM mikroskopiaren aldetik, elektroi sorta nagusi kontrolatu bat laginera bideratzen da eta sortak laginarekin interakzionatu ondoren sortutako erradiazio mota desberdinak neurtzen dira. Horrela, neurtutako erradiazioaren arabera laginaren irudiez gain informazio desberdina atera daiteke, hala nola laginaren konposizioari buruzko informazioa edota fase desberdinen identifikazioa. Kasu honetan Zientzia eta Teknologia fakultatean dagoen SGIker zerbitzuen "mikroskopia elektroniko eta materialen mikroanalisi" saileko bi mikroskopio elektroniko erabili dira, *SEM W filament (JEOL JSM-6400)* eta *SEM of Schottky field emission (JEOL JSM-7000F)*, biak SEM motakoak izanik.

Emisibitatea neurtzeko Materialen Ezaugarri Termofisikoen Ikerketa Taldearen HAIRL (*High Accuracy Infrared Radiometer, Leioa*) emisometroa erabili da (del Campo et al., 2006). Taldeak berak diseinatu eta eraiki zuen instrumentua eta bere lehenengo abiaraztetik hainbat modifikazio jasan ditu, tresna eta neurketa-metodoak pixkanaka hobetuz eta garatuz. Azken eguneraketa 2020. urtean aurkeztu zen (de Arrieta et al., 2020).

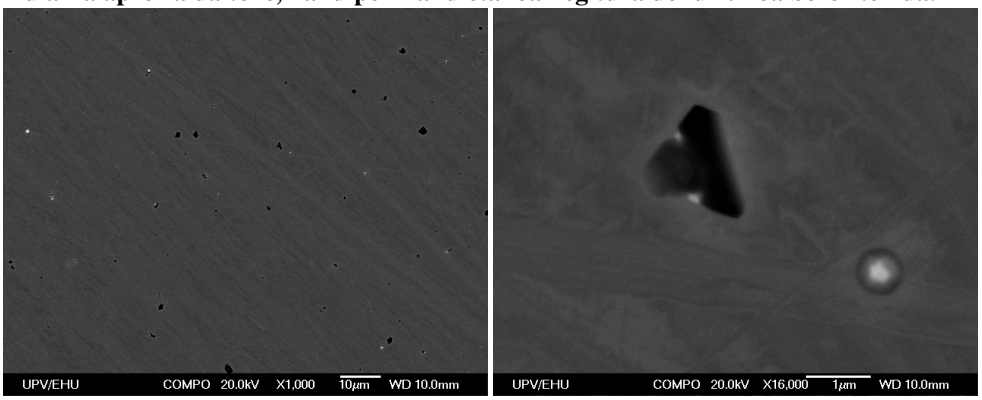
Lau elementu nagusiz dago osatuta instrumentua: Fourier-en transformatu bidezko espektrometro infragorria (FT-IR), erreferentziazko gorputz beltza, laginak neurtzea ahalbidetzen duen ganbera eta FT-IRan gorputz beltzaren ala laginaren erradiazioa sartzen duen sistema optikoa.

Berogailu batez doitutako lagin-euskarrian muntatzen dira laginak. Berogailua erresistentzia elektriko batez osatuta dago lagina 1000 °C-ra eramatea ahalbidetzen duena, eta laginaren gainazaleko tenperatura K motako termopareen bidez neurtzen da. Lagin-euskarria ganberaren barruan dagoen biraketa-ardatzera lotzen da. Ganberaren barruan atmosfera ezberdinetan egin daitezke emisibitate neurketak (atmosfera erreduktorean edo 10^{-4}mbar-eko hutsean, esaterako) eta ganbera bera uraren bitartez hozten da laginaren ingurune termikoa kontrolatzeko. Sistema osoaren zein neurketa-metodoaren zehaztasunak azken eguneraketari dagokion artikuluan kontsulta daitezke (de Arrieta et al., 2020).

3.2 Berotu aurreko mikroegituraren ezaugarritzea

Lagina soluzio solido batez eta bi prezipitatu desberdinez osatua dagoela erakutsi dute elektroi erretrodispertsatu bidezko SEM irudiek (SEM-BSE). Matrizea osatzen duen soluzio solidoak egitura *azikularra* azaltzen du handipen txikietan, hau da, fase bakar hori osatzen duten orratz formako egitura luze eta finak. Horrez gain, handipen handietako mikrografiek prezipitatuen inguruko matrizearen egitura dendritikoa erakusten dute, bai eta prezipitatuetako bat, argia, itxura globularrekoa dela eta beste prezipitatuak, beltzak, alde lauak dituenez koherentea dela matrizearekiko. Gainera, prezipitatu txuri eta beltzak hein handi batean elkarrekin agertzen dira, txuria beltzaren barruan txertatuta egonik. Denak 1. Irudian dira ikusgai.

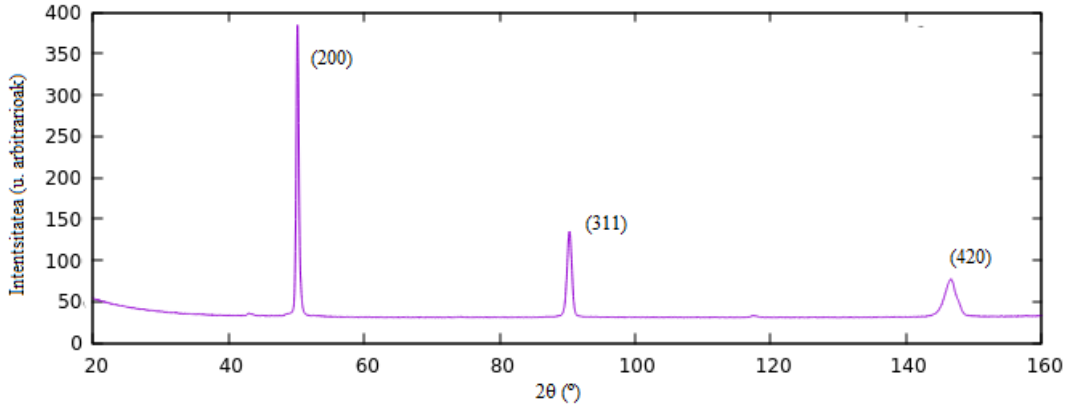
1. Irudia: Elektroi erretrodispertsatuen SEM irudiak handipen desberdinetan. Prezipitatu txuri, prezipitatu beltz eta gris tonu desberdineko matrizea ikusgai dira bertan. Handipen gutxiko irudian matrizearen egitura azikularra aprezia daiteke, handipen handietakoan egitura dendritikoa bereizten da.



Konposizioari dagokionez, egindako azterketek matrizearen ez homogeneitatea erakusten dute, Cantor aleazioaren karakteristikoak diren elementuek konposizio ekimolarretik $\%5$-eko desbideraketak erakutsiz.

Prezipitatu beltzaren konposizioaren aldetik, oxigeno ($\%27$) eta manganeso ($\%21$) kontzentrazio nabariak ageri ditu, bai eta Cantorraren elementuen kontzentrazio anitzez ere txikiagoaz gain aluminio eta titanio trazak. Beraz prezipitatu hau gehienbat manganeso oxidoz osatua dagoela esan genezake.

2. Irudia: Hauts-XRD difrakzio patroiean neurturiko intentsitateak $2\theta(^\circ)$ difrakzio angeluarekiko.



Prezipitatu txuriaren aldetik, Cantorraren elementuen batura txikia da, bost elementuen arteko batura ez baita $\%30$-ra heltzen, gainera, prezipitatuaren gai nagusiak hafnioa ($\%14$) eta oxigenoa ($\%38$) dira. Aipatzekoa da hafnioa elementu errefraktarioa izanik honen urtze urtze tenperatura altua dela, galdaketa prozesuan lortzen direnak baino askoz handiagoa eta ondorioz lagina sortu aurreko prezipitatua da. Horrela, galdaketan erabilitako materialen ezpurutasuna izanen da ziurrenik.

Hauts X-izpi difrakzioaren neurketek, 2. Irudian, $a = 0.3596$ nm sare parametroko fcc egitura kubikoaren islapenei lotutako hiru gailur nagusi erakutsi zituzten. Patroian agertu diren hiru gailurrak (200), (311) eta (420) erreflexioei dagozkie hurrenez hurren. Horien zabalera handiek gorputz difraktatzaile, hau da kristaltxoen tamaina txikia adierazten dute eta erreflexio gutxi eta intentsitate erlatiboak materialaren testura handiaren seinale dira, bai eta fase kristalino nagusi bakarraz osaturiko material baten aurrean gaudela.

Testura analisiak aipatutako hiru erreflexio horien jarraipena eginez gauzatu ziren eta gailuaren berezko software bidezko datu tratamenduak testura handia erakusten dute. Izan ere laginaren bolumenaren $\%65$ betetzen duen lau orientazio kristalografiko aurkitu ziren, hortik $\%50$ $[001]$ lagin norabidean orientaturiko kristaltxoak izanik. Galdatze prozesuko tenperatura gradienteen eta ondoriozko kristaltxoen hazte faboratuei egokitu zaie hori.

3.3 Emisibitate neurketa

Emisibitatea neurtzeko, ganberaren barruan 10^{-4} mbar-eko ordenako huts izan arte itxaron da lagina berotzen hasi aurretik. Laginaren emisibitate normalaren neurketak egin dira lau tenperatura ezberdinetarako, 100 °C-tik hasita 400 °C-ra iritsiz eta ehun graduko pausoetan berotuz.

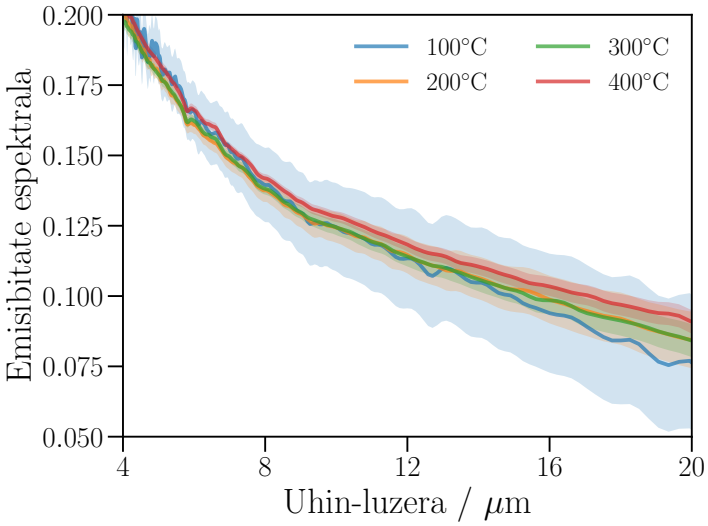
Jasotako emisibitatearen neurketek lagin metaliko baten ohiko erantzuna azaltzen dute, 3. Irudian ikus daitekeenez, uhin-luzera handitu ahala monotonikoki txikitzen baitoa emisibitatea. Tenperatura baxuenean egindako neurketetan zenbait gorabehera nabarmentzen dira, baina horiek zaratari eta bestelako errore sistematikoei atxikitzen dizkiegu, 200 °C-tan egindako neurketan ez baitira azaltzen. Gainera, argi gelditzen da behe-tenperaturako neurketen ziurgabetasuna goikoena baino askoz txikiagoa dela. Bestetik, emisibitateak ez du aldaketa esanguratsurik jasaten neurtutako tenperatura-eremuan.

3.4 Berotu osteko mikroegituraren ezaugarritzea

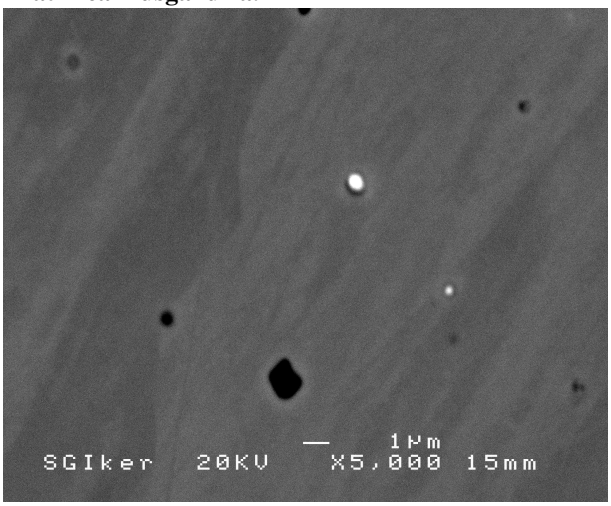
Emisibitatearen neurketak burutu ostean mikroegitura berriro karakterizatu da. Mikroegitura aldetik garapen nabarmena ikusi da laginean, izan ere, handipen txikietan egitura azikularra oraindik ikusgai bada ere, handipen handietan (4. Irudian) ageri zen egitura dendritikoa guztiz desagertu da. Prezipitatuek aldiz forma eta tamaina aldetik berdin jarraitzen dute. Azterketa konposizionalek lehendik presente zauden elementuen kontzentrazioak berdin mantendu direla erakutsi dute prezipitatu eta matrizean. Horrela, matrize eta prezipitatuek ez dute oxigenorik erakusten beraz badirudi 400 °C-rako igoera ez dela nahikoa izan oxidazio prozesuak aktibatzeko.

XRD bidezko testura-analisiari dagokionez, laginaren testuraren murrizketa nabarmena ikusi da. Kalkulurako erabilitako 4 osagaiek orain bolumenaren $\%18$ betetzen dute eta gai nagusia zen egitura fibrosoa $\%50$-etik $\%10$-

3. Irudia: Cantor aleazioaren emisibitate espektral normalaren neurketak uhin-luzerarekiko, lau tenperatura ezberdinetan.



4. Irudia: Elektroi erretrodispertsatuen SEM irudiak handipen handian. Prezipitatu txuri, prezipitatu beltz eta gris tonu desberdineko matrizea ikusgai dira.



era jaitsi da. Testura murrizketa hori bat dator egitura dendritikoa desagertzearekin, eta adierazten du materialak birkristalizazioa izan duela emisibitate-neurketen bitartean, non tenperatura 400ºC-ra arte igo den.

Hortaz, tratamendu termiko hori suberaketa prozesua kontsidera daiteke. Garrantzitsua da adieraztea ez dela inolako aldaketarik behatu emisibitate-neurketetan birkristaltzeko fenomeno horrekin erlaziona daitekeenik. Hori dela eta, emisibitatea testurarekiko independentea dela esan daiteke.

4 Ondorioak

Cantor aleazio lagin batean 100 °C eta 400 °C arteko norabidezko emisibitate espektralaren azterketa egin da lehenengoz espektro infragorrian esperotako erantzun metalikoa ikusiz. Aldi berean, laginaren karakterizazio mikroestrukturala gauzatzea posible izan da eta honen eboluzioa aztertu da, konposizio eta fase kristalinoen aldetik aldaketarik ez ikusiz. Mikroskopia bidezko mikroanalisiak egitura dendritikoaren desagertzea erakutsi du eta XRD analisiak testura murriztea, bata bestearen ondorio izanez. Gainera garrantzitsua da emisibitate eta testuraren arteko erlazioa: lehengoaren jokaera esperotakoa izan bada ere bigarrenean eboluzio nabarmena ikusi da eta ondorioz

kasu honetan bata bestearekiko independenteak direla adierazten du ikerketak.

5 Etorkizunerako planteatzen den norabidea

Alde batetik interesgarria izanen litzateke tenperatura altuagoko mikroegitura eboluzio desberdinik dagoen behatzea, edota oxidazio edo prezipitazio dinamikak zer tenperaturatan aktibatzen diren ikustea, beraz tenperatura altuagoko suberatzeen eboluzioak aztertzea espero da. Honekin batera lan hau osatuko da tenperatura altuagoko neurketak eginez, bai eta emisibitatean inpaktu handia izan ditzaketen oxido geruzen eragina aztertzen.

Erreferentziak

Cantor, B., Chang, I., Knight, P., & Vincent, A. (2004). Microstructural development in equiatomic multicomponent alloys. *Materials Science and Engineering: A*, 375:213–218.

Chen, J., Zhou, X., Wang, W., Liu, B., Lv, Y., Yang, W., Xu, D., & Liu, Y. (2018). A review on fundamental of high entropy alloys with promising high–temperature properties. *Journal of Alloys and Compounds*, 760:15–30.

de Arrieta, I. G., Echániz, T., Fuente, R., Campillo-Robles, J. M., Igartua, J. M., & López, G. A. (2020). Updated measurement method and uncertainty budget for direct emissivity measurements at the university of the basque country. *Metrologia*, 57(4):045002.

del Campo, L., Pérez-Sáez, R. B., Esquisabel, X., Fernández, I., & Tello, M. J. (2006). New experimental device for infrared spectral directional emissivity measurements in a controlled environment. *Review of scientific instruments*, 77(11):113111.

Eissmann, N., Muehle, U., Gaitzsch, U., Walther, G., Weissgaerber, T., & Kieback, B. (2021). Precipitation hardening of high entropy alloy cocrfemnni containing titanium. *Journal of Alloys and Compounds*, 857:157610.

Howell, J. R., Mengüç, M. P., Daun, K., & Siegel, R. (2020). *Thermal radiation heat transfer*. CRC press.

Larrañaga Varga, A. (2020). Textura y estrés: las aplicaciones olvidadas de la difracción de rayos x en materiales. *Revista de Química*, 34(1-2):15–21.

Miracle, D. B. & Senkov, O.Ñ. (2017). A critical review of high entropy alloys and related concepts. *Acta Materialia*, 122:448–511.

Wagner, F. (1999). *Texture Determination by Using X ray Diffraction*, 169–186. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg.

Yeh, J.-W., Chen, S.-K., Lin, S.-J., Gan, J.-Y., Chin, T.-S., Shun, T.-T., Tsau, C.-H., & Chang, S.-Y. (2004). Nanostructured high-entropy alloys with multiple principal elements: novel alloy design concepts and outcomes. *Advanced engineering materials*, 6(5):299–303.

6 Eskerrak eta oharrak

Egileek Eusko Jaurlaritzari eskerrak ematen dizkiote ikerketa-proiektuen bidez (IT-1714-22, PIBA-2021-1-0022) lan hau finantziatu izanagatik. J. Gabirondo-Lópezek Euskal Herriko Unibertsitateari eskerrak eman nahi dizkio bere ikerkuntza doktorego aurreko beka baten bitartez (PIF21/06) finantziatzeagatik.

Dislipidemiaren aurkako tratamendu berriak nanopartikulak erabiliz

Ane San José[1], Asier Larrea[1,2], Shifa Jebari[1], Asier Benito[1], Kepa Uribe[1], Unai Galicia[1], Cesar Martín[1]

1 Department of Biochemistry and Molecular Biology, UPV/EHU, 48940 Leioa, Bizkaia
2 1 Biofisika Institute (UPV/EHU, CSIC), Barrio Sarriena s/n., 48940 Leioa, Bizkaia

asurteaga@gmail.com

Laburpena

Hiperkolesterolemia dislipidemia ohikoena da, eta odoleko LDL-C (ingelesetik, *low-density lipoprotein cholesterol*) maila altua izateagatik bereizgarria da. LDL-C maila altuak zuzenean lotu izan dira gaixotasun kardiobaskularrak garatzeko arriskuarekin; horregatik, garrantzitsua da gaixotasun horri aurre egiteko terapia berriak garatzea. Ikerketa honen helburua izan da ApoE (ingelesetik, *Apolipoprotein E*) proteinan oinarritutako nanopartikulak garatzea azido bempedoikoaren, estatinen eta siRNA (ingelesetik, *small interfering RNA*)-ren bidezko tratamenduen eraginkortasuna hobetzeko. Izan ere, LDL barneraketa eta LDLr (ingelesetik, *low-density lipoprotein receptor*) adierazpena kuantifikatu dira tratamenduak probatu ostean, eta emaitza esangarriak lortu dira.

Hitz gakoak: ApoE proteina; nanopartikulak; hiperkolesterolemia; siRNA; estatinak; azido bempedoikoa

Abstract

Hypercholesterolemia is the most frequent dyslipidemia and is characterized by its high level of Low-density Lipoprotein cholesterol (LDL-C) in blood. High LDL-C levels are directly related to the risk of developing cardiovascular diseases, so it is important to develop new therapies to treat this disease. The objective of this study was to develop ApoE protein based nanoparticles to improve the efficacy of treatments with bempedoic acid, statins and small interfering RNA (siRNA). In fact, the uptake of LDL and low-density lipoprotein receptor (LDLr) expression have been quantified after treatment testing and significant results have been obtained.

Keywords: ApoE protein; nanoparticles; hypercholesterolemia; siRNA; statins; bempedoic acid

1. Sarrera eta motibazioa

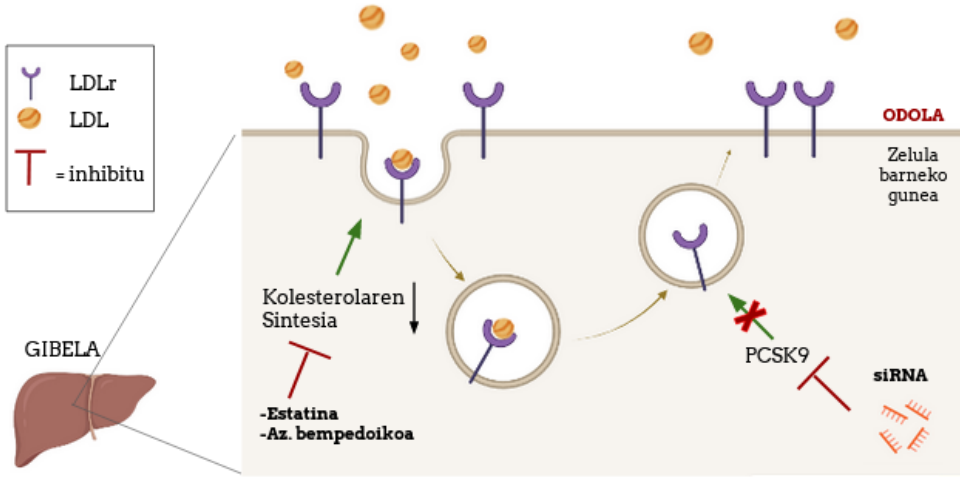
OME (Osasunaren Mundu Erakundea)-ren arabera gaixotasun kardiobaskularrak heriotza-arrazoi nagusia dira mundu mailan, eta gaixotasun kardiobaskularren garapenarekin lotutako arrisku-faktoreetako bat dislipidemiak (odoleko lipido kopuruaren asaldaketak) dira. Izan ere, kolesterol plasmatiko totalaren eta LDLengatik garraiatutako kolesterolaren (LDL-C) mailaren igoerak giza populazio helduaren % 15ari inguru eragiten dio. Horregatik, arazo soziosanitario garrantzitsua da hiperkolesterolemia (Mattingly, 2023; Lorenzo, 2017).

Aipatutako LDL (ingelesetik, *Low Density Lipoprotein*)-ari jendeak arrunki “kolesterol txar” esaten dio. Eta berez, izen hori ez da batere okerra, LDL-C mailaren igoera zuzenean lotuta baitago

aterosklerosiaren agerpenarekin eta gaixotasun horri lotutako beste arazo kardiobaskularrekin (hipertentsioa eta bihotzekoak, besteak beste). Bestalde, hiperkolesterolemiaren eragileak genetikoak zein ingurugiroak eragindakoak (dieta, bizimodua, beste gaixotasun batzuk…) izan daitezke (Frayn, 2010). Arrazoi genetikoei dagokienez, LDLr (ingelesetik, *LDL receptor*) hartzailean gertatzen diren mutazioak dira nagusi, gaixotasuna eragiten duten mutazioen % 80-85 baitira. LDLr-ak, hain zuzen ere, LDLa zelulan barneratzeaz arduratzen dira, zelulak geroago ezabatu ahal izateko (1. irudia). Hortaz, mekanismo hori asaldatuta egonez gero, egoera patologikoak sor daitezke. Bestalde, beste mutazio batzuk ApoB (mutazioen % 5-10) eta PCSK9 (ingelesetik, *proprotein convertase subtilisin/kexyn type 9*) (mutazioen % 2) geneetan gertatzen dira (Galicia-Garcia et al., 2020a).

Gaur egun, hiperkolesterolemia tratatzeko medikamenturik erabiliena estatinak dira, hau da, kolesterolaren sintesia inhibitzen dutenak HMG-CoA erreduktasa izeneko entzimaren mailan. Hala ere, farmako horien efektua ez da kolesterolaren sintesia murriztera mugatzen. Horrez gain, zelularen kolesterol maila jaisteak LDLr-en ekoizpena igotzea eragiten du, eta LDLr-en gainadierazpen horrek, bereziki gibelean, odoleko LDLak zelulan barneratzea. Ondorioz, odoleko kolesterol maila netoa murrizten da (1. irudia).

1. irudia: LDLr-en gainadierazpena eta LDL barneraketa estatina/azido bempedoiko/siRNA tratamenduen ondorioz. Estatinek eta azido bempedoikoak kolesterolaren sintesiaren inhibizioaren bidez LDLr-en gainadierazpena eragiten dute. siRNAk, ordea, PCSK9ren ekoizpena inhibitzeari esker, LDLr-ak ez degradatzea eta, ondorioz, horiek birziklatzea ahalbidetzen du.



Dena dela, estatinek zenbait albo-ondorio dituzte, hala nola gastrointestinalak, neurologikoak, larruazaleko gorritasuna, miopatiak (oinaze, ahultasun eta neke muskularra)... (Lorenzo, 2017). Gainera, ikusi da estatina dosi altuek bigarren motako diabetesa eragin dezaketela luzarora (Galicia-García et al., 2020b). Horregatik, ikerketa honetan, besteak beste, estatinen tratamenduaren eraginkortasuna hobetzeko asmoarekin nanopartikulak eratu dira.

Era berean, estatinen ordez erabili daitekeen beste tratamendu bat proposatzen da lan honetan; jada fase klinikoan dagoen *Inclisiran* izeneko farmakoaren antzeko mekanismoa jarraitzen duena, eta PCSK9 proteinaren ekoizpenari eragiten diona (Banerjee et al., 2022). Alde batetik, PCSK9 proteinak LDLr-ak degradatzea du helburu, horren ondorioz, kontzentrazioa murrizten da eta, beraz, LDL maila handitzen da. Bestetik, *Inclisiran*a siRNA (ingelesez, *small interfering RNA*) bat da, PCSK9ren RNA mezulariari lotzen zaiona eta degradatzen duena; beraz, PCSK9 proteina ez da ekoizten (1. irudia). siRNAak oso desegonkorrak dira, eta laguntza izan ezean euren itura iristeko, degradatu egiten dira. *Inclisiran*ek arazo horri aurre egiteko, azido nukleiko bereziak eta ituratzeko balio duten molekula batzuk erabiltzen ditu. Modu horretan, PCSK9 mailak murriztea lortzen du era oso egonkor, baina

garestian. Hori horrela, siRNA gure nanopartikulei batzea proposatzen dugu, siRNA degradatu ez dadin eta zeluletan barneratzeko.

'Nanopartikula' izenak dioen bezala, nanometrotako tamaina duten egiturak dira, eta ikerketa honen kasuan, dipalmitoilfosfatidilkolina (DPPC) lipidoaz eta ApoE proteinaz egon dira osatuta. Lipidoa erabili da tratamenduak (estatina, azido bempedoikoa edo siRNA) atxikita eramateko balio duen bitartekari bezala; proteina, aldiz, lipido besikulak egituratzeko, eta farmakoak gure intereseko organora ituratzeko. Izan ere, ApoEk gerriko baten modukoa eratzen du lipidoen inguruan eta, ondorioz, disko edo esfera itxurako egiturak sortzen dira (Jebari-Benslaiman et al., 2022; Pitas et al., 1980). Bestalde, ApoE espezifikoki lotzen da lehen aipatutako LDLr-ekin, ondorioz, LDLr-ak oso ugariak direnez gibelean (Mahley et al., 2009), nagusiki gure nanopartikulak gibelera bideratzea da asmoa. Behin ituratuta, aipatutako tratamenduek LDL hartzaileen adierazpena eta LDLen barneratzea eragitea espero da.

2. Arloko egoera eta helburuak

Nanopartikulak urteetan zehar erabili izan dira biomedikuntzan tratamenduak hobetzeko asmoarekin. Izan ere, zenbait ikerketatan jada estatinak kapsulatu izan dira nanopartikuletan (Duivenvoorden et al., 2014). Bestalde, aterosklerosia tratatzeko, HDLak (ingelesetik, *High Density Lipoprotein*) imitatzen dituzten nanopartikulen eraketak ikerketa urte luzeak ditu atzetik (Jebari-Benslaiman et al., 2022; Ou et al., 2021). Hortaz, ez da harritzekoa hiperkolesterolemia tratatzeko nanopartikulen bidezko terapia berriak garatu nahi izatea.

2020an farmako berri bat onetsi zuen FDAk (US Food and Drug Administration) hiperkolesterolemia tratatzeko, azido bempedoikoa. Medikamentu horrek LDL-C balioak murrizten ditu kolesterolaren sintesian parte hartzen duen entzima bat inhibituz, estatinak bezala. Haatik, azido bempedoikoak ATP zitrato liasa entzimaren mailan inhibitzen du kolesterolaren sintesia. Gainera, farmako horrek zenbait albo-ondorio (muskulu-espasmoak, gehiegizko azido urikoa odolean, min abdominala…) dituen arren, estatinen albo-ondorio ohikoenetako bat ekiditen du, mialgia. Gainera, estatinen eta azido bempedoikoaren terapia konbinatuak emaitza esangarriak lortu ditu (Markham et al., 2020; Marrs et al., 2020). Horregatik, ikerketa honetan helburuak hurrengoak izan dira:

- Estatinak, azido bempedoikoa eta siRNA bezalako terapiak gibelera ituratzea ApoEn oinarritutako nanopartikulen bidez, albo-ondorio extrahepatikoak ekiditeko asmoz.
- Azido bempedoikoaren eta estatinen arteko terapia konbinatua garatzea, estatinen dosia murrizteko helburuarekin. Horrela, epe luzera bigarren motako diabetesaren garapena bezalako albo-ondorioak murriztu ahal izateko.
- Bai estatinen, bai azido bempedoikoaren eraginkortasuna handitzea nanopartikula ituratuen bidez. Ondorio modura LDLr-en gainadierazpena eta LDLen barneraketa esangarria lortu nahi delarik.
- Nanopartikuletan kapsulatutako azido bempedoiko bidezko tratamendu eraginkorra garatzea, estatinekiko intoleratzia garatzen duten gaixoei alternatiba berri bat eskaintzeko.

3. Ikerketaren muina

3.1. Nanopartikulen eraketa eta karakterizazioa

Prozesuaren amaieran lortzen ziren nanopartikula guztiak oinarrian ApoE3 proteinaz eta DPPC lipidoz osatuta zeuden. Hala ere, euren artean desberdinak ziren bost nanopartikula mota prestatu ziren (1. taula): nanopartikula hutsa (estatinarik, azido bempedoikorik eta siRNArik gabekoa), estatina

zeramana (Estatina), azido bempedoikoa zeramana (A. B.), estatina eta azido bempedoikoa zeramatzana (Konbinazioa) eta siRNAk zeuzkana (siRNANano). Horretarako, lehenengo, lagin guztien lipido geruza eratzeko, lipidoa N_2rekin lehortu zen; estatina zeramaten laginen kasuan, ordea, lipido eta estatina nahastea izan zen lehortutakoa . Ondoren, bi orduz hutsean sartu ziren, eta hutsetik atera ostean, A. B. eta Konbinazioa laginei azido bempedoikoa gehitu zitzaien. Horren ostean, berriro ere N_2rekin lehortu, eta hutsean sartu ziren. Hurrengo pausoan, beste protokolo baten arabera purifikatutako ApoE3a (Argyri et al., 2011) gehitu zitzaien lagin guztiei 1:2,5 (lipido: ApoE3) ratioan. Prozesuaren puntu honetan, nanopartikulek hainbat lipido geruza dituzten besikula erraldoien itxura izan ohi dutenez, laginak sonikatu ziren, lipido geruza bakarreko nanopartikulak lortzeko helburuarekin. Azkenik, hondarrak kentzeko, 0,2µm-ko filtroarekin filtratu ziren.

siRNA zuten nanopartikulen kasuan, nanopartikula hutsak 90 minutuz 37ºC-tan inkubatu ziren siRNArekin, molekula hau nanopartikulen mintzean itsasten delako.

1. taula: Nanopartikula mota desberdinen konposizioa.

	DPPC	ApoE3	Estatina	Azido Bempedoikoa	siRNA
Hutsa	✔	✔	✘	✘	✘
Estatina	✔	✔	✔	✘	✘
A.B.	✔	✔	✘	✔	✘
Konbinazioa	✔	✔	✔	✔	✘
siRNANano	✔	✔	✘	✘	✔

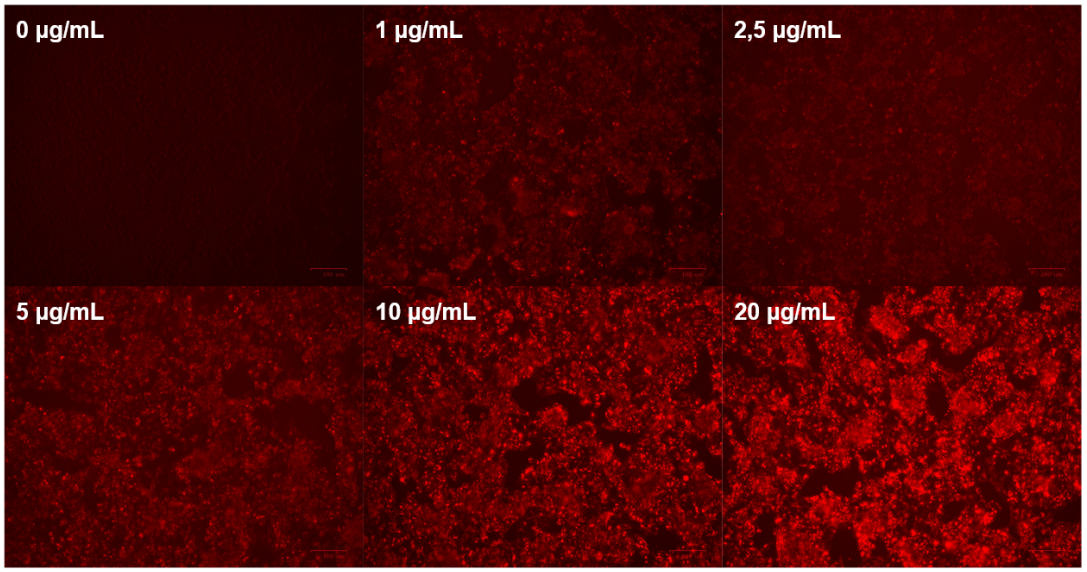
Behin nanopartikulak eratu zirela, espero zen tamaina eta itxura zutela egiaztatzeko, DLS (ingelesetik, *Dynamic Light Scattering*) eta dikroismo zirkular teknika espektroskopikoak erabili ziren, hots, argiaren eta materiaren elkarrekintzan oinarritzen diren teknikak. Alde batetik, DLSaren emaitzen arabera, 30nm inguruko nanopartikulak lortu ziren, esperotako tamainaren barruan zeudenak (Jebari-Benslaiman et al., 2022). Bestetik, dikroismo zirkularraren bidez, ApoE3 proteina nanopartikularen egituran integratu den aztertu zen. Horretarako, alfa helizidadea neurtu zen, hain zuzen ere, alfa helize deritzo proteinaren aminoazido-kate batzuek espazioan hartzen duten konfigurazioari. Beste ikerketa batzuetan azaldutakoaren arabera (Pitas et al., 1980; Jebari-Benslaiman et al., 2022), ApoE proteina nanopartikularen mihiztaketaren parte denean, alfa helizidadea igotzen da. Izan ere, hori izan zen gure emaitzetan lortutakoa.

3.2. Nanopartikulen barneraketa

Nanopartikula mota bakoitzak zelulengan zuen eragina neurtu baino lehen, nanopartikulek zelula barrura sartzea lortzen ote zuten aztertu zen. Horretarako, nanopartikulak DiI deritzon markatzaile fluoreszentearen bidez markatu ziren, eta kontzentrazio desberdinetan inkubatu ziren zelulekin. Horretarako, HuH7 (ingelesetik, *Human Hepatoma 7*) zelula-lerroa erabili zen, giza gibel batetik eratortzen direlako, eta LDLr ugari adierazten dituelako, nanopartikulen sarrera ahalbidetzen duena. Zelulen hazkundea optimoa izan zenean, zelulak nanopartikulekin inkubatu ziren 48 orduz, eta fluoreszentziazko mikroskopioaren bidez nanopartikulak barneratzen zirela antzeman zen (2. irudia).

Emaitzetan ikusi zen fluoreszentzia handitzen dela, nanopartikulen kontzentrazioa zenbat eta altuagoa izan. Aitzitik, 20 µg/mL-tik aurrera fluoreszentzia igoera ez zen hain nabarmena izan (2. irudia). Hortaz, saioetan nanopartikulen 10 µg/mL-ko kontzentrazioa erabili zen.

2. irudia: DiIrekin markatutako nanopartikulen barneraketa kontzentrazio desberdinetan (0-20 µg/mL), fluoreszentziazko mikroskopiaren bidez ikusita. Eskala: 100µm. Zenbat eta nanopartikula kontzentrazio handiagoa, orduan eta fluoreszentzia biziagoa lortu zen.



3.3. Zitometria saioak

Zitometria zelulak banan-banan analizatzea ahalbidetzen duen teknika da; izan ere, dispertsatutako argian edo igorritako fluoreszentzian oinarrituta zelulen ezaugarri fisiko-kimikoak ezagut daitezke. Ikerketa honen kasuan, zitometria zelulen LDL barneraketa eta LDL hartzaileen adierazpena neurtzeko erabili zen.
Alde batetik, LDL barneraketa neurtzeko, LDL molekulak DiI markatzaile fluoreszentearekin markatu ziren. Metodo horren arabera, zenbat eta LDL gehiago barneratu, orduan eta fluoreszentzia gehiago kuantifikatu zen. Bestetik, LDL hartzaileen adierazpena neurtzeko, zelulek ekoiztutako LDL hartzaileei espezifikoki lotzen zaien antigorputz primarioak erabili ziren, eta ostean, antigorputz primario horiei lotzen zaizkien antigorputz sekundarioak, alegia, fluoreszentzia igortzen dutenak.

Beraz, bai LDL barneraketa saioan, bai LDL hartzaileen adierazpen saioan, zelulak 48 orduz inkubatu ziren nanopartikula mota guztiekin, siRNA zuten nanopartikulekin izan ezik. Azken kasu horretan, zelulak 24 orduz baino ez ziren mantendu nanopartikulekin, PCSK9ren adierazpena murrizteko; hala ere, zelulak jada nanopartikularik gabe, hurrengo 24 orduak hazkuntza medioan mantendu ziren, guztira 48 ordu izateko. Bestalde, hainbat kontrol gehitu ziren, nanopartikulen eragina zein zen ikusteko. Kontrol hauetan zelulak estatina, bempedoiko, bi konposatuekin batera eta nanopartikularik gabeko siRNArekin inkubatu ziren, nanopartikulak eratzeko jarritako kontzentrazio berdinetan.

LDL barneraketa saioan, LDL-DiIak gehitu ziren nanopartikulen inkubazioa amaitu ondoren, eta 24 orduz mantendu ziren kultibotan. Hori dela eta, inkubazioen ostean, zelulak birritan garbitu ziren, neurketa oztopa zezaketen hondarrak kentzeko. Azkenik, zelulen fluoreszentzia intentsitateak zitometria bidez neurtu ziren.

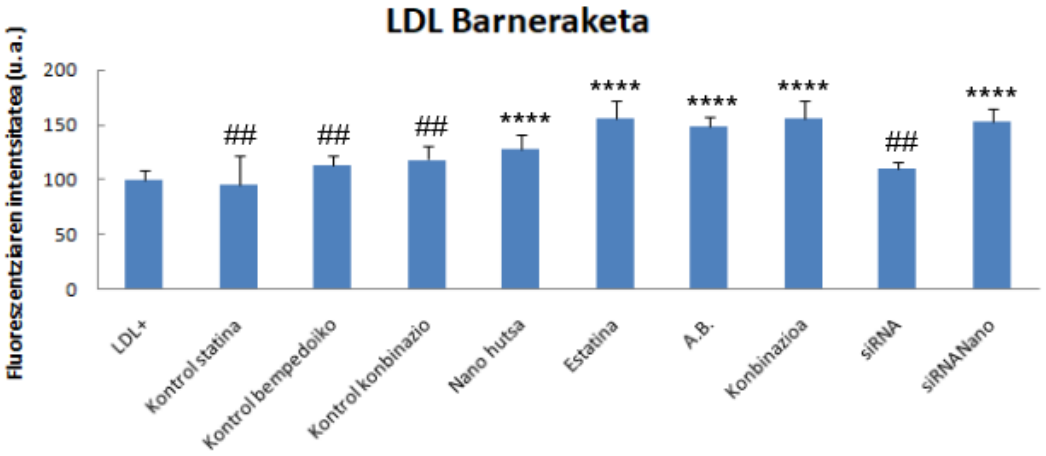
LDLr adierazpen saioan, aldiz, behin nanopartikulen inkubazioa amaituta, zelulak fixatu ziren, momentu horretan mintzean zeuden hartzaileak bertan mantentzeko. Ondoren, hartzailearen kontrako antigorputzak erabili ziren, fluoreszentzia zutenak, eta hori erabili zen zitometria bidez LDL hartzaile maila neurtzeko.

Aipatu beharra dago saio bakoitzaren hiru erreplika egin direla, eta saio bakoitzeko kondizio bakoitzaren 4 erreplika egon direla. Gainera, emaitzen analisi estatistikoa egiteko bi buztaneko Studenten t banaketa erabili da. *p balioa* < 0,05 zenekotan esangarritzat hartu da.

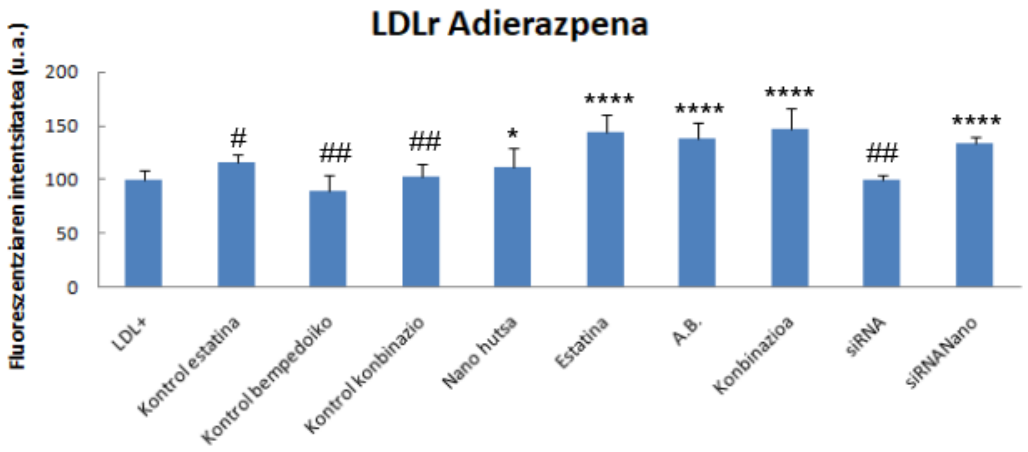
Emaitzei dagokienez (3. eta 4. irudiak), aztertutako tratamendu ezberdinen eraginkortasuna handitzen da nanopartikulen erabilerarekin. *Statin, Bempe, Mix* eta *siRNANano* laginen kasuan, antzeko LDL barneraketa lortu zen, hain zuzen ere, gainerako kondizio guztietan lortutakoa baino handiagoa.
LDL hartzaileen adierazpena ere modu esangarrian handitzen da nanopartikulak erabiltzen direnean. Izan ere, nanopartikulen erabilerarekin lortutako LDLr adierazpena kontrolekin lortutakoa baino nabariagoa zen kasu guztietan. Hala ere, *Estatina*ren eta *Kontrol estatina*ren arteko desberdintasuna ez da gainerako kasuetan lortutakoa bezain esangarria.

Dena dela, LDL barneraketaren zein LDLr adierazpenaren emaitzetan, nanopartikula mota ezberdinen arteko desberdintasuna ez da esanguratsua. Hortaz, estatinen eta azido bempedoikoaren eragin sinergikoa ezin da ukatu, ezta onartu ere. Estatinarekin eta Konbinazioarekin tratatuko zelulek emaitza oso antzekoak izan dituztelako (3. eta 4. irudiak).

3. irudia: DiIrekin markatutako LDL molekulen barneraketaren kuantifikazioa zitometria bidez, zelulak nanopartikula mota desberdinekin inkubatu ostean. Nanopartikulen erabilerak LDL barneraketa handitzen du. Errore-barra bakoitzak batezbestekoa ± desbiderapen estandarra (DE) adierazten du. ****p < 0,0001 tratamendurik gabeko kontrolarekiko (LDL+) konparatuta; $^{\#\#}$p < 0,0001 nanopartikuladun tratamendu bakoitza haren kontrolarekiko. u. a.: unitate arbitrarioa.



4. irudia: Nanopartikulen erabilerak eragindako LDL hartzaileen adierazpenaren kuantifikazioa zitometria bidez neurtuta, zelulak nanopartikula mota desberdinekin inkubatu ostean. Nanopartikulen erabilerak LDL hartzaileen gainadierazpena eragiten du. Errore-barra bakoitzak batezbestekoa ± DE adierazten du. *p < 0,05 eta ****p < 0,0001 tratamendurik gabeko kontrolarekiko (LDL+) konparatuta; $^{\#}p$ < 0,001 eta $^{\#\#}$p < 0,0001 nanopartikuladun tratamendu bakoitza haren kontrolarekiko. u. a.: unitate arbitrarioa.



4. Ondorioak

Nanopartikula bidezko tratamendu desberdinak probatu ostean, hurrengoa ondorioztatu da:

- Nanopartikulen erabilerak estatinak eta azido bempedoikoa bezalako farmakoen eraginkortasuna handitzen du. Nolanahi ere, bi tratamendu horien arteko eragin sinergikoa ezin izan da ondorioztatu. Horretarako, bestelako saio gehigarriak egin beharko lirateke.
- Ezin daiteke esan nanopartikulen bidezko siRNA, estatina, azido bempedoiko edo konbinazio tratamenduetatik zein izan daitekeen esperantzagarriagoa, euren artean ez baitago alde esangarririk.
- siRNAk aitxikita daramaten nanopartikulek LDL barneraktea eta LDLr adierazpen balio esangarriak eragiten dituztenez, suposa daiteke nanopartikulak lortzen duela siRNA zelulara ituratzea degradatu gabe.

5. Etorkizunerako planteatzen den norabidea

Egindako saioetan emaitza esangarriak lortu diren arren, ApoEn oinarritutako nanopartikula bidezko terapia berriak garatzeko lehen urratsak baino ez dira. Etorkizunean euren eragina aztertu beharko da giza ehunak imitatzen dituzten kultibotan eta animalietan, saio klinikoetan gizakiekin probatu baino lehen. Bestalde, farmakoen dosiak findu beharko dira, estatinen eta azido bempedoikoaren arteko sinergia nanopartikuletan ebaluatu eta nanopartikularen sistemak albo-ondoriorik eragiten duen aztertu. Hala ere, hiperkolesterolemia duten pazienteen pronostikoa hobetzera hel daitekeen terapia garatzea da etorkizuneko helburua.

6. Erreferentziak

Argyri, L., Skamnaki, V., Stratikos, E., & Chroni, A. (2011). A simple approach for human recombinant apolipoprotein E4 expression and purification. *Protein expression and purification*, *79*(2), 251–257. https://doi.org/10.1016/j.pep.2011.06.011

Banerjee Y, Pantea Stoian A, Cicero AFG, Fogacci F, Nikolic D, Sachinidis A, Rizvi AA, Janez A, Rizzo M. (2022). Inclisiran: a small interfering RNA strategy targeting PCSK9 to treat hypercholesterolemia. *Expert Opin Drug Saf.*, 21(1), 9-20. doi: 10.1080/14740338.2022.1988568

Duivenvoorden, R., Tang, J., Cormode, D. P., Mieszawska, A. J., Izquierdo-Garcia, D., Ozcan, C., Otten, M. J., Zaidi, N., Lobatto, M. E., van Rijs, S. M., Priem, B., Kuan, E. L., Martel, C., Hewing, B., Sager, H., Nahrendorf, M., Randolph, G. J., Stroes, E. S., Fuster, V., Fisher, E. A., … Mulder, W. J. (2014). A statin-loaded reconstituted high-density lipoprotein nanoparticle inhibits atherosclerotic plaque inflammation. *Nature communications*, *5*, 3065. https://doi.org/10.1038/ncomms4065

Frayn, K. N., & Frayn, K. N. (2010). *Metabolic regulation : a human perspective* (3rd ed.). Wiley-Blackwell, Chichester.

Galicia-Garcia, U., Amuategi, J., Jebari, S., Larrea-Sebal, A., Uribe, K.B., Ostolaza, H., Martin, C., Benito-Vicente, A. (2020a). *Hiperkolesterolemia Familiarra: patofisiologia, diagnostikoa eta tratamendua, 4(1)*, 69. http://doi.org/10.26876/osagaiz.1.2020.299

Galicia-Garcia, U., Jebari, S., Larrea-Sebal, A., Uribe, K. B., Siddiqi, H., Ostolaza, H., Benito-Vicente, A., & Martín, C. (2020b). Statin Treatment-Induced Development of Type 2 Diabetes: From Clinical Evidence to Mechanistic Insights. *International journal of molecular sciences*, *21*(13), 4725. https://doi.org/10.3390/ijms21134725

Jebari-Benslaiman, S., Uribe, K. B., Benito-Vicente, A., Galicia-Garcia, U., Larrea-Sebal, A., Santin, I., Alloza, I., Vandenbroeck, K., Ostolaza, H., & Martín, C. (2022). Boosting Cholesterol Efflux from Foam Cells by Sequential Administration of rHDL to Deliver MicroRNA and to Remove Cholesterol in a Triple-Cell 2D Atherosclerosis Model. *Small (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)*, *18*(13), e2105915. https://doi.org/10.1002/smll.202105915

Lorenzo Velázquez, B. (2017): *Velázquez Farmacología Básica y Clínica, 19a Ed*, Editorial Médica Panamericana, Ciudad de México, México.

Mahley, R. W., Weisgraber, K. H., & Huang, Y. (2009). Apolipoprotein E: structure determines function, from atherosclerosis to Alzheimer's disease to AIDS. *Journal of lipid research*, *50 Suppl*(Suppl), S183–S188. https://doi.org/10.1194/jlr.R800069-JLR200

Markham A. (2020). Bempedoic Acid: First Approval. *Drugs*, *80*(7), 747–753. https://doi.org/10.1007/s40265-020-01308-

Marrs, J. C., & Anderson, S. L. (2020). Bempedoic acid for the treatment of dyslipidemia. *Drugs in context*, *9*, 2020-6-5. https://doi.org/10.7573/dic.2020-6-5

Mattingly, Q. (2023). *Health topics, Cardiovascular diseases.* WHO, World Health Organization. Berreskuratua 2023ko otsailaren 20a, https://www.who.int/health-topics/cardiovascular-diseases#tab=tab_1 -etik

Ou, Lc., Zhong, S., Ou, Js. *et al.* (2021). Application of targeted therapy strategies with nanomedicine delivery for atherosclerosis. *Acta Pharmacol Sin* **42**, 10–17 https://doi.org/10.1038/s41401-020-0436-0

Pitas, R. E., Innerarity, T. L., & Mahley, R. W. (1980). Cell surface receptor binding of phospholipid . protein complexes containing different ratios of receptor-active and -inactive E apoprotein. *The Journal of biological chemistry*, *255*(11), 5454–5460.

7. Eskerrak

Eskerrak Cesar Martinen laborategiko kide guztiei ikerketa honen bidean gidatzeagatik, bereziki Asier Larrea-Sebali.

Kutsatutako eraikuntza-materialen lixibiaziotik eratorritako kutsatzaileen eraginaren ebaluazioa ondoko lurzoruetan

Iñaki Vázquez de la Fuente, Nagore Prieto-Taboada, Ainara Gredilla Altonaga, Gorka Arana, Juan Manuel Madariga

Kimika Analitikoa Saila, Zientzia eta Teknologia fakultatea, Euskal Herriko Unibertsitatea (UPV/EHU), P.K. 48940, Leioa, Bizkaia

inaki.vazquez@ehu.eus

Laburpena

Kontzentrazio handietan metal astunak arriskutsuak izan daitezke lurzoruetan. Horregatik, oso interesgarria da lixibiazio-egoerak aztertzea, non ur-fase batek gainazal solido bateko metal adsorbatuak mugitzen dituen. Lan honetarako lurzoruko laginak hartu ziren urtetan metatutako karga kutsatzaile handia zuen eraikin historiko baten ondoan, Punta Begoña (Bizkaia). Lurzoruan zegoen metalen kontzentrazioa Indukzio Bidez Akoplatutako Plasma - Masa Espektrometria (ICP-MS) erabilita determinatu zen. Eraikinaren oinarrian kokatutako lurretan metatutako metalak Fe, Mg, Na, Ba eta Co izan ziren bereziki, zeinak lixibiazioaren ondorioz metatu izan ahal diren. Lurzoruen Legeko (4/2015) Ebaluazio Balio Adierazgarriak (EBA balioak) kontuan hartuta, Punta Begoña Pb-z kutsatuta egoteko arriskua badagoela ondorioztatu zen.

Gako-hitzak: lurzorua, ICP-MS, metal astunak, Punta Begoña, VIE-B

Abstract

Heavy metals can be dangerous at high concentrations in the soil. Therefore, it is very interesting to study leaching situations, where an aqueous phase can mobilize the metals absorbed by a solid surface. Soil samples were taken next to a historic building with a high polluting load accumulated over the years, Punta Begoña (Bizkaia). These samples were analyzed by Inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) to know their metallic composition. The metals accumulated at the base of the building were Fe, Mg, Na, Ba and Co, which may indicate a metallic contribution from the façade due to leaching effects. Using the VIE-B values defined in the BOE2015 for the Autonomous Community of the Basque Country, it was is seen the presence of Pb contamination in Punta Begoña.

Keywords: soil, ICP-MS, Heavy metals, Punta Begoña, VIE-B

1. Sarrera eta motibazioa

Lurzorua funtsezkoa da organismo askoren biziraupenerako. Animaliek eta landareek jaten, ibiltzen, bizi, ezkutatzen eta gozatzen dute lurzoruan, baina lurzoruarekin hain hurbil dagoen elkarrekintza hori arriskutsua izan daiteke. Adibidez, kontzentrazio handietan toxikoak izan daitezkeen konposatuak metatzen direnean, lurzoruaren eta organismoen arteko harremana toxikoa bihur daiteke.

Metal astunak, berez, lurzoruan egoten dira, jatorrizko materialen meteorizazio-prozesu geologikoetatik abiatuta, aztarnatzat hartzen diren maileta n (<1.000 mg kg^{-1}) eta gutxitan toxikoak diren maileta n. Hala ere, landa- eta hiri-inguruneetako lurzoru gehienek metal astun bat edo gehiago metatzen dituzte definitutako balioen gainetik, giza osasuna, landareak, animaliak, ekosistemak edo bestelako baliabideak arriskuan jartzeko adinako kontzentrazioetan (Wuana eta Okieimen, 2011).

Lurzoruan metatutako metal astunak iturri antropogeniko askoren ondorio izan daitezke: azkar hedatzen ari diren industria-eremuetako emisioak, inguruko meatzeak, metal-eduki handiko hondakinen ezabaketa gasolina eta beruna duten pinturen erabilera, lurrean ongarriak aplikatzea, animalien simaurra, hondakin-uren lohiak, pestizidak, ikatzaren errekuntzako hondakinak eta petrokimikoen isuriak (García-Florentino et al., 2020). Gainera, metal gehienek ez dute degradazio mikrobianorik edo kimikorik izaten, eta horregatik lurzoruetan pilatzen dira. Lurzoru kutsatuetan dauden metal astun ohikoenak, ugarienetik gutxien agertzen denera ordenatuta, ondorengoak dira: Pb, Cr, As, Zn, Cd, Cu eta Hg. (Wuana eta Okieimen, 2011).

Lurzoruarekin gertatzen den bezala, eraikin batek ingurumenarekin elkarrekintza estua dauka. Beraz, lurzoruei eragiten dieten kutsadura-iturriek eraikin batean ere eragina izan dezakete, are gehiago mende-hasierako eraikinei buruz hitz egiten dugunean. Horrela, eraikinen materialek atmosferako kutsatzaileak xurgatzen eta pilatzen dituzte (Prieto-Taboada et al., 2013). Era berean, eraikinetan finkatutako kutsatzaileak urteak egon daitezke bertan finkatuta. Baina, badira horien mugikortasuna areagotzen duten prozesuak, adibidez lixibiazioa.

2. Arloko egoera eta ikerketaren helburuak

Lixibiazio prozesuak solutu bat bere matrize solidotik bereiztean datza, disolbatzaile likido baten eraginez. Lurzoru baten konposizio metalikoa ulertzeko beharrezkoa da ingurua aztertzea, izan ere, lurzorutik hurbil metal ezberdinen iturri diren materialak egon daitezke. Horrela, lixibatuak izan daitezkeen eta lurzoruan meta daitezkeen metalen zerrenda zehaztu daiteke. Oso aztertua izan den adibide bat trafiko nabarmena duten errepideen alboan kokatutako lurretan isurketa-uren eraginez metatzen diren metal astunen kasua da. Errepide-inguruneetan aztertu ohi diren metalak Cd, Cr, Cu, Pb, Ni eta Zn dira (Werkenthin et al., 2014). Eraikinen kasuan, ekarpen metalikoa egiturak berak duen konposizioaren ondorio izan daiteke. Esaterako, Corten altzairuaren konposizioa gehienbat burdina da, baina Cr, Cu, Ni eta P kantitate txikiak ere baditu. Lixibiazioaren eraginez, elementu horiek eraikinaren inguruko lurzoruan metatu daitezke (Kamimura et al., 2006).

Beraz, eraikin zaharrak ere kutsadura-iturri bat izan daitezke, lixibiazio-prozesuen ondorioz (Li, 2001), bereziki, industria-jarduera handiko guneetatik hurbil egon badira. Kutsadura hori egituraren konposizioaren beraren ondorio izan daiteke, edo urteetan zehar eraikinean gertatu den kutsatzaileen pilaketaren ondorioa. Bigarren kasu horren adibide bat Punta Begoñako (1. irudia) galeriak dira. Eraikin hori 1918an eraikitako hormigoi armatuzko eraikina da, eta Getxoko (Bizkaia) kostaldean dago kokatua.

1. irudia. Punta Begoña eraikinaren satelite-ikuspegia gorriz nabarmendua.

Punta Begoña eraikina aztertu zen diziplina anitzeko proiektu baten barruan (Madariaga et al., 2019; Morillas et al., 2019; Mollá et al., 2019), eta iturri kutsatzaile askoren eraginpean dagoela ondorioztatu zen. Historikoki, industriak garapen handia izan duen eremu batean dago kokatuta, eta ondorioz, iraganean kutsatzaile ugari isuri da bertako atmosferara (García-Florentino et al., 2020). Urteetan zehar industriak bilakaera izan du eta ingurumenean eragin txikiagoa duten teknikei bide eman die. Hala ere, aurreko urteetan kontzentrazio handietan atmosferara isurirako

metalak (beruna, kasu) eta kutsatzaile organikoak eraikinaren egituran pilatuz joan dira (Prieto-Taboada et al., 2013). Gainera, Punta Begoñaren inguruko industria-jarduera nabarmena da oraindik ere. Kokaleku honetako beste kutsadura-iturri batzuk trafikoa eta itsas aerosola dira. Punta Begoñaren fatxadan metatzen diren partikuletatik datorren metal-ekarpena ere aztertu da, eta metal astunak daudela ikusi da, hala nola Fe, Cr, Ti, Pb, Zn, Ce, etab (Morillas et al., 2019).

Hori guztia kontuan hartuta, gure helburua Punta Begoñako fatxadaren ondoan dagoen lurzoruaren konposizio metalikoa aztertzea izan da. Horrela, eraikinak ondoko lurzoruetan izan dezakeen eragina ikertu nahi izan da.

3. Ikerketaren muina

3.1 Kokapena eta laginketa

Urteetan zehar fatxadan metatzen joan diren kutsatzaileen kopuru handia kontuan hartuta, Punta Begoñako galeriak (PB) lixibiazio-iturri potentzial gisa aukeratu ziren. Laginketarako eremu bezala eraikinaren ipar-mendebaldeko aldea aukeratu zen errepide baten ondoan eta itsasoaren aurrean dagoelako.

6 lagin hartu ziren, haien artean 20 cm-ko tartea utzi zen (1. irudia). Lehenengo puntua PB-ko fatxadaren oinarriaren ondoan hartu zen eta iturri horretatik urrunduz hurrengoak hartu ziren. Lurzoruko laginak biltzeko, lehenik belarra aitzur batekin kendu zen, eta ondoren, eskuzko lagingailu batekin lurzoru zati bat atera zen. Horrela, 15 cm-ko sakonerako laginak lortu ziren. Lagin bakoitza 5 cm-ko zatitan banatu zen, sakonerako profila lortzeko. Azkenik, laginak lau egunez utzi ziren lehortzen erauzketa-kanpai batean, giro-tenperaturan.

2. irudia. Laginketa-puntuaren deskribapena, non laginketa-puntu bakoitzaren zenbakia eta puntuen arteko distantzia adierazten diren.

3.2 Laginaren aurretratamendua elementu-analisirako

Lurzoru-laginetan dauden elementu metalikoen analisi kuantitatiboa induktiboki akoplatutako plasma duen masa-espektrometriaren (ICP-MS) bidez egin zen. Analisi hori egiteko laginak aurretratatu behar izan ziren.

Partikula-tamaina homogeneizatzeko, laginak 10 minutuz bahetu ziren 2 mm-ko sare-begia duen bahetzaile automatiko bat erabiliz (OKTAGON, Endecotts). ICP-MS bidezko analisia egiteko, erauzketa-etapa bat behar izan zen metalak fase likidora pasatzeko. Erauzketa mikrouhinen bidezko digestio azidoaren bidez egin zen, lurzoru-laginetarako optimizatutako

metodo baten bidez (Carrero et al., 2013). Metodo hori EPA 3051A metodoaren egokitzapena da, US Environmental Agency-k proposatua (acid digestion of sediments, sludges, soils and oils) (Method 3051A, 2007). Digestioaren bidez lortutako erauziak 0,45 µm Millex HV PVDF (Waters corporation) iragazkiekin iragazi ziren 50 mL-ko polipropilenozko falcon hodi batean, eta Milli-Q urarekin parekatu ziren.

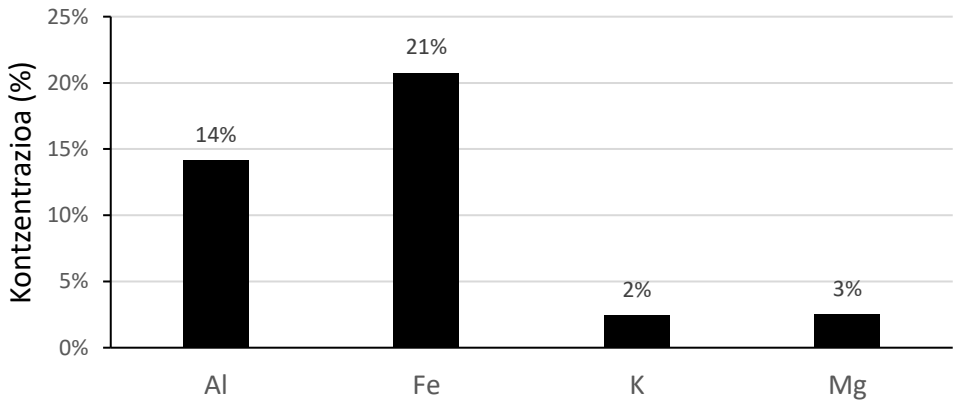
Estraktuak HNO_3-aren kontzentrazioa %1 izateko diluitu ziren espektrometroan sartu baino lehen. IPS-MS bidezko analisirako NexION 300 (PerkinElmer) masa-espektrometroa erabili zen. Espektrometroak lau polo hirukoitz ditu eta 100 klaseko gela garbi batean dago. ^{7}Li, ^{27}Al, ^{88}Sr, ^{98}Mo, ^{107}Ag, ^{120}Sn, ^{121}Sb, ^{137}Ba, ^{184}W, ^{202}Hg, ^{205}Tl eta ^{208}Pb isotopoak aztertu ziren. Kinetic energy diskrimination (KED) moduan, berriz, ^{23}Na, ^{24}Mg, ^{39}K, ^{44}Ca, ^{47}Ti, ^{59}Co, ^{63}Cu, ^{66}Zn, ^{75}As, ^{111}Cd, ^{51}V, ^{52}Cr, ^{55}Mn, ^{56}Fe, ^{60}Ni eta ^{78}Se izan ziren. KED metodoarekin talka moduan He erabiltzen da interferentzia poliatomikoak kentzeko. Azkenik, NexION 1.5 (Nexion Software) softwarea erabiliz datuak aztertu ziren elementuen analisi kuantitatiboa egiteko.

4. Ondorioak

4.1 Metalen konposizio-analisia

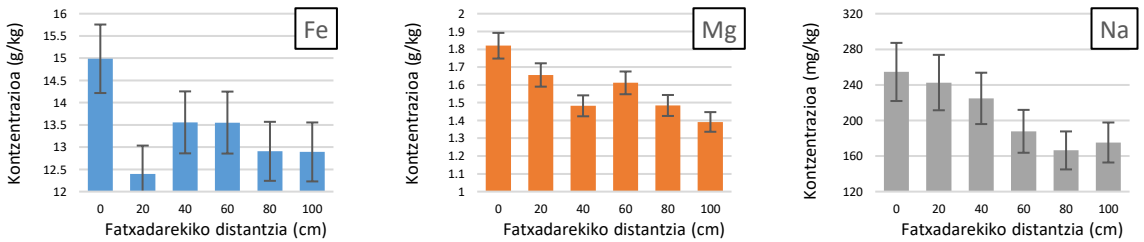
Konposizioari buruzko datuak aztertuz gero, lagin guztien elementu nagusiak Al eta Fe izan ziren (% 14 eta % 21). Ondoren, K eta Mg ziren ugarienak (3. irudia).

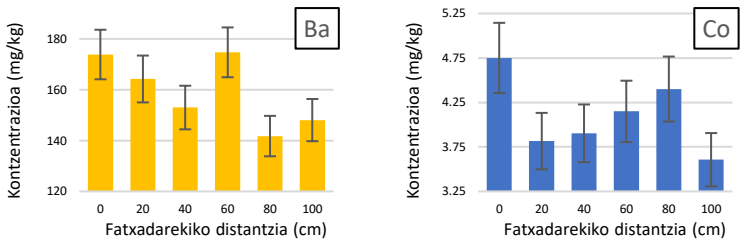
3. irudia. Punta Begoña inguruko lurzoruko-laginetan dagoen Al, Fe, K eta Mg elementuen ehunekoen batez bestekoa.



Azterketa espaziala egiteko (4. Irudian adierazten dena) ez ziren sakonera desberdineko laginak desberdindu eta batez bestekoa egin zen puntu bakoitzean sakonera desberdinetarako lortutako kontzentrazioekin. Punta Begoñako fatxadatik gertu metaketa handiena zuten metalak Fe, Mg, Na, Ba eta Co izan ziren, 4. irudian ageri den bezala. Kontzentraziorik handiena “0” puntuan jaso zen, fatxadatik hurbilen zegoen laginean. Aldiz, eraikinetik urruntzean hauen presentzia txikitzen zen.

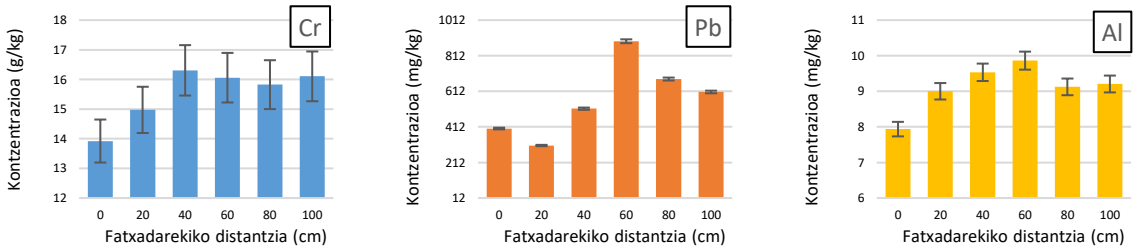
4. irudia. Laginketan presentzia handiena erakutsi zuten elementuen kontzentrazioak. Desbiderapen estandar erlatiboaren batez bestekoa % 8,54 izan zen.





Beraz, metaketa hau adierazten du Punta Begoña fatxadatik ekarpen metaliko bat dagoela lixibiazio prozesuengatik. Aldiz, Punta Begoñako fatxadatik urruntzean kontzentrazioa handitzen zuten metalak Cr, Pb eta Al izan ziren, 5. irudian ikus daitekeen bezala. Metal horiek iturri kutsatzaile desberdinetatik etor daitezke, hala nola hurbileko errepidetik, industria-jardueratik edo itsasoko aerosoletik.

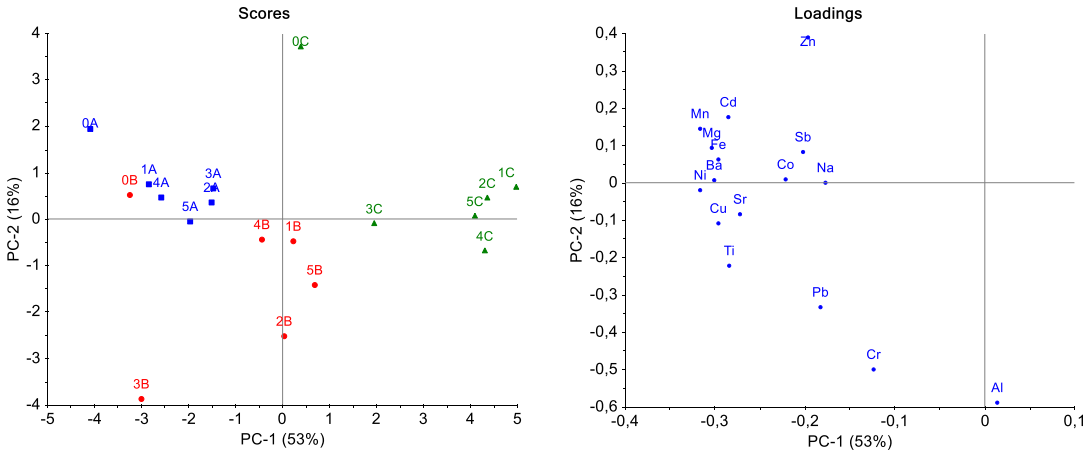
5. irudia. Punta Begoñako fatxadatik urruntzean kontzentrazioa handitzen zuten elementuen kontzentrazioak. Desbiderapen estandar erlatiboa % 6 baino gutxiago izan zen.



Sakonera-profilak aztertzeko Osagai Nagusien Analisia (PCA, *Principal Component Analysis*) erabili zen. Jasotako lurzoru-laginak 5 cm-ko sakonerako hiru zatitan banatu ziren, eta kasu honetan laginak honela izendatu ziren: A azaleratik hurbilen dagoen eremua, B tarteko eremua eta C sakonera handieneko eremua. Datu-matrizea autoeskalatu ondoren, bi osagaiekin osatutako PCA eredua aukeratu zen, bariantza osoaren %69 azaltzen zuelarik.

PC1-PC2 scores grafikoan (6. irudia) ikusi daitekeen moduan, laginen sakoneraren araberako multzokatzea antzematen da. Loadings grafikoan oinarrituz esan dezakegu lehenengo osagai nagusiak laginak azterturiko elementuen presentziaren arabera (Al izan ezik) banatzen dituela scores-en grafikoan zehar. Horrela, lodings-en eremu negatiboan agertzen diren laginak erlazio zuzena izango dute scores-en grafikoan eremu berean dauden laginekin. Era berean, PC2 bereizten ditu B eremuaren lagin batzuk (3B, 2B eta 5B) Al, Cr eta Pb kontzentrazioaren arabera.

6. irudia. Punta Begoñan jasotako lurzoruko laginekin egindako PCA azterketa, sakoneraren arabera sailkatuta, non A sakonera txikieneko eremua den eta C sakonera handienekoa.

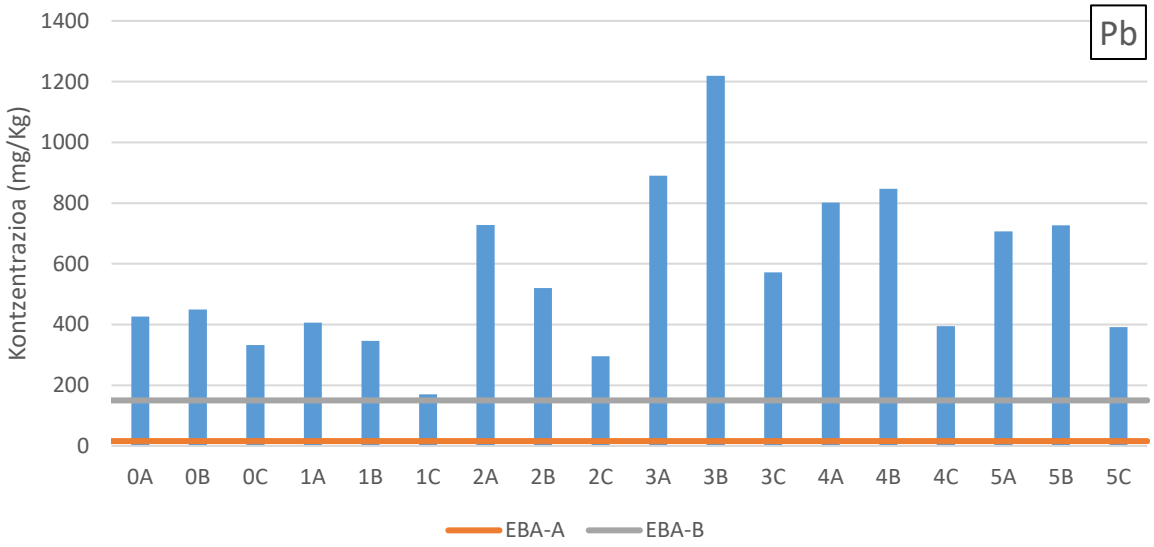


4.2 Euskal Autonomia Erkidegoko lurzoruetarako ebaluazio-balio adierazleak

Aztertutako lurzoruen poluzio-maila ebaluatzeko, Lurzoruen Legeko (4/2015) Ebaluazio Balio Adierazgarriak (EBA balioak) erabili dira erreferentzia gisa. Dokumentu honetan bi kontzentrazio-muga zehazten dira lurzoruentzat, A eta B ebaluazioko balio adierazleak (EBA-A eta EBA-B). Substantzia jakin bat Euskal Autonomia Erkidegoko lurzoruetan modu naturalean aurkitzen den kontzentrazio-tartearen goi-muga definitzen duen estandarra da EBA-A. Kontzentrazio-muga handiagoak dituen EBA-B estandarra da, eta kontzentrazio horren gainetik lurzorua aldatuta dagoela eta kutsatuta egon daitekeela esan liteke. EBA-B lurzoruaren erabilera desberdinetarako definitzen da; beraz, gure lurzoruak ebaluatzeko, "hiri-ingurune" balioak erabili ziren.

EBA-A mugak Ba, Pb, Cu, Zn eta Cb elementuetarako gainditu ziren fatxadarekiko distantzia guztietan eta sakonera guztietan. EBA-B mugei dagokienez, Pb metalarentzat bakarrik gainditu zen (>150 mg/kg). Aztertutako puntu guztiek sakonera guztietarako kontzentrazio-muga gainditu zuten, 7. irudian ikus daitekeen bezala. Gainera, berun-ekarpena denboran zehar eman dela ikus daiteke, sakonera guztietan mantentzen da eta. Beraz, ez dirudi berun-ekarpen hori gertaera puntuala izan denik. Nolanahi ere, argi dago beruna lurzoruaren lehen zentimetroetan metatzen dela (A eta B). Beraz, berunaren kontzentrazio-balio horiek ez dira lurzoruaren konposizioaren berezkoak eta horrek kanpoko ekarpena adierazten du. Bereziki bi kutsadura-iturri desberdinek eragin dezakete hori. Alde batetik, aldameneko errepidean dabiltzan ibilgailuen ekarpen (trafikoa) historikoa, eta bestetik, inguruko portuaren jarduera handiaren ekarpen zuzena.

7. irudia. Punta Begoñako lurzoruetako berunaren kontzentrazioa. Euskal Autonomia Erkidegorako definitutako Ebaluazio Balio Adierazgarriak (EBA-A eta EBA-B mugak) adierazi dira.



5. Etorkizunerako planteatzen den norabidea

Lan honetan, Punta Begoñako fatxadaren ondoko lurzoruan metatu izan diren zenbait metal aztertu dira. Metal hauen jatorri bezala, lurzoruek berez izan dezaketen eduki metalikoaz gain, 3 iturri posible desberdindu dira (aztergai den elementuaren arabera aldatzen direnak): i) Punta Begoñako fatxada bera lixibiazioz egindako ekarpena, ii) aztergai den eremutik hurbil dagoen trafikoa (egungoa eta historikoa), eta iii) eraikinaren inguruan ematen den portu jarduerarekin erlazionatuta dagoena.

Etorkizunean, kutsadura-iturri desberdinak dituzten lurzoruak azter litezke, beste kontzentrazio-gradiente batzuk aztertzeko, hala nola errepideetatik edo egitura metalikotik gertu dauden lurzoruak. Gainera, interesgarria litzateke iturri kutsagarrien eraginpean egon ez diren lurzoruak aztertzea.

Azkenik, lan honetan ikusi den berunaren presentzia nabarmena sakonkiago aztertu beharko litzateke; izan ere, lagin batzuek metal horretarako definitutako EBA-B balioak laukoiztu egin zituzen.

6. Erreferentziak

Agencia Estatal Boletín Oficial del Estado (2015). Ley 4/2015, de 25 de junio, para la prevención y corrección de la contaminación del suelo. Boletín Oficial del Estado (BOE-A-2015-8272), 178, 62274-62310. https://www.boe.es/boe/dias/2015/07/24/pdfs/BOE-A-2015-8272.pdf

Carrero J.A., Arrizabalaga I., Bustamante J., Goienaga N., Arana G., Madariaga J.M. (2013). Diagnosing the traffic impact on roadside soils through a multianalytical data analysis of the concentration profiles of traffic-related elements. Science of The Total Environment, 458–460, 427–434. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.04.047

García-Florentino C., Maguregui M., Ciantelli C., Sardella A., Bonazza A., Queralt I., Carrero J.A., Natali C., Morillas H., Madariaga J.M., et al. (2020). Deciphering past and present atmospheric metal pollution of urban environments: The role of black crusts formed on historical constructions. Journal of Cleaner Production, 243, 118594. https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2019.118594

Kamimura T., Hara S., Miyuki H., Yamashita M., Uchida H. (2006). Composition and protective ability of rust layer formed on weathering steel exposed to various environments. Corrosion Science, 48(9), 2799–2812. https://doi.org/10.1016/j.corsci.2005.10.004

Li X. (2001). Heavy metal speciation and leaching behaviors in cement based solidified/stabilized waste materials. Journal of Hazardous Materials, 82(3), 215–230. https://doi.org/10.1016/S0304-3894(00)00360-5

Madariaga I., Lama E., Calparsoro E, Prieto-Taboada N., Arana G., Rodríguez Laso M.D., Madariaga J.M. (2019). Enhancement and recovery of the tiles affected by atmospheric pollutants in the Galleries of Punta Begoña, Getxo (Bizkaia). Boletín de la Sociedad Española de Cerámica y Vidrio, 58(4), 161–170. https://doi.org/10.1016/j.bsecv.2018.11.001

Mollá L.D., Zabaleta A., Uriarte J.Á., Aranburu A., Sagarna M. (2019). Geología y patrimonio cultural construido: enfoque transdisciplinar en las Galerías Punta Begoña (Getxo, Bizkaia). Geogaceta, 66, 123-126.

Morillas H., Marcaida I., Maguregui M., Upasen S., Gallego-Cartagena E., Madariaga J.M. (2019). Identification of metals and metalloids as hazardous elements in PM2.5 and PM10 collected in a coastal environment affected by diffuse contamination. Journal of Cleaner Production, 226, 369–378. https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2019.04.063

Prieto-Taboada N., Ibarrondo I., Gómez-Laserna O., Martinez-Arkarazo I., Olazabal M.A., Madariaga J.M. (2013). Buildings as repositories of hazardous pollutants of anthropogenic origin. Journal of Hazardous Materials, 248-249, 451-460. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2013.01.008

U.S. EPA. (2007). "Method 3051A (SW-846): Microwave Assisted Acid Digestion of Sediments, Sludges, and Oils," Revision 1. Washington, DC.

Werkenthin M., Kluge B., Wessolek G. (2014). Metals in European roadside soils and soil solution – A review. Environmental Pollution, 189, 98–110. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2014.02.025

Wuana R.A., Okieimen F.E. (2011). Heavy Metals in Contaminated Soils: A Review of Sources, Chemistry, Risks and Best Available Strategies for Remediation. ISRN Ecology, 2011, 1–20. https://doi.org/10.5402/2011/402647

7. Eskerrak eta oharrak

Lan hau Espainiako Ikerketa Agentziaren AIE (MINEICO/FEDER-UE) bidez finantzatutako DEMORA (Grant No. PID2020-113391GB-I00) proiektuek babestu dute

Itsasaldiak eta urte-sasoiak oskol-dimentsioen eta oskol-dentsitatearen moldapena dakar *Mytilus galloprovincialis* muskuiluan

Maitane Pérez-Cebrecos[1,3], Xabier Berrojalbiz[1], Denis Benito[2,3] , Urtzi Izagirre[2,3], Irrintzi Ibarrola[1]

[1] Genetika, Antropologia Fisikoa eta Animalien Fisiologia Saila, FEMB ikerketa taldea, eta [2] Zoologia eta Animalia Zelulen Biologia Saila, CBET ikerketa taldea. Zientzia eta Teknologia Fakultatea, Euskal Herriko Unibertsitatea (UPV/EHU), Leioa

[3]Itsas Biologia eta Bioteknologia Esperimentalen Ikerketa Zentroa (PiE-UPV/EHU), Euskal Herriko Unibertsitatea (UPV/EHU), Plentzia

maitane.perez@ehu.eus

Laburpena

Muskuiluetan, oskolaren osotasunak biziraupena zehazten duen heinean, hautespen-presio indartsu baten menpe dago, eboluziorako eragile oinarrizkoa bilakatzen duena. Ikerketa honetan, urtaro eta itsasaldiak izan dezaketen eragina aztertu da oskolaren dentsitatean eta oskol dimentsioen eskala-erlazioetan. Muskuiluak bi hilabetetan (maiatza eta azaroa) eta bi populazioetatik (mareartea eta mareazpia) jaso ziren. Populazio-jatorriak eragin handia dauka muskuiluen oskol-forman, egokitzapen morfologiko espezifiko bat izanik mareartеko habitat gogorrera moldatzeko. Oskol dentsitatea, aldiz, urtaroaren arabera aldatzen da: oskol sendoagoak ageri dira maiatzean, neguko baldintzen isla izan daitekeena. Emaitzek muskuilu-hazkuntza ulertzeko baliagarriak dira, hainbat aplikazio zientifiko dituztelarik; hala nola, ekologian edo toxikologian.

Hitz gakoak: *Mytilus galloprovincialis,* oskola, sasoia, marea-eremuak

Abstract

Because shell integrity determines survival, shell form is subject to strong selection pressure, turning it a fundamental evolutionary driving force. In the present study, the alleged effect of both season and habitat upon shell dimensions and density have been analysed. Mussels where sampled in May and November, and from two different populations (intertidal and subtidal). The results show a major impact of the population origin upon the shell form of mussels, which might be a specific morphological adaptation to the harsh intertidal environment. Shell density, conversely, changes with seasonality: denser shells appear in May, which may be an answer to the winter conditions. The results are useful to understand mussel growth, which has in turn many scientific applications.

Keywords: Mytilus galloprovincialis, shell dimensions, shell density, tide-levels

1. Sarrera eta motibazioa

Oskolaren osotasunak biziraupena bermatzen duen heinean, oskol-forma hautespen-presio indartsu baten menpe egon liteke, eboluziorako eragile oinarrizkoa bilaka dezakeena. Izatez, jakina da oskol dimentsioak aldatu egiten direla ingurumen-faktoreen arabera, baita habitat espezifikoetan bizitzearen arabera (adib. Akester eta Martel, 2000; Steffani eta Branch, 2003; Babarro eta Carrington, 2011). Mareartеko habitat harritsuen baldintzek aldakortasun handia duten habitatak sortzen dituzte; batez ere, mareartеko habitatetan orokorrak diren faktoreen ondorioz: lehorketara esposizio periodikoak, muturreko tenperaturak eta olatuekiko esposizioa (Alunno-Bruscia et al., 2001; Steffani & Branch, 2003; Kirk et al., 2007; Márquez et al., 2015). Fluktuazio horiek murritzagoak dira mareazpian, non baldintza fisikoak homogeneo eta egonkorragoak diren.

Oskolaren ekoizpena, baina, nahiz eta funtsezkoa, garestia da energiari dagokiola, muskuiluetan energia-gastu totalaren % 25-50 –a izatera ere heldu baitaiteke (Hawkins eta Bayne, 1985; Gardner eta Thomas, 1987; Steffani eta Branch, 2003). Horrela, guztiz alda dezake muskuiluek beste egituretara bideratzen duten energia-esleipena; esate baterako, ehun bigunen hazkuntzara bideratzen duten energia. Muskuiluaren oskolak faktore abiotiko eta biotikoen aurrean babesten badu ere (Burnett eta Belk, 2018), oskolaren ezaugarriak ere alda daitezke gorputz-tamainarekin. Izan ere, gorputz-tamainaren eragina nekez aztertzen den parametro endogenoa da, edo, behintzat, ez modu espezifikoan.

Gainera, oskolak erabili daitezke hainbat ingurumen ezberdinetan gerta daitezkeen aldaketa intraespezifikoak aztertzeko, batez ere kontuan hartuta oskolaren formak eragina izan dezakeela

oskola beraren errendimenduan (Penney et al., 2007; Fitzer et al., 2014). Esan bezala, molusku bibalbioen osotasun estrukturalak ahalbidetzen die bizirautea fisikoki estresagarriak diren ingurumenetan eta sendo eragiten du beste organismoekiko elkarrekintzetan, direla harrapakariak, direla komunitate biologikoaren gehiengo kideak.

2. Arloko egoera eta ikerketaren helburuak

Honako ikerketa honetan, aztertu da urtaro eta habitatak izan dezaketen eragina oskolaren dentsitatean eta oskol dimentsioen eskala-erlazioen gain. Ikerketaren hipotesi orokorra izan da oskol morfologia aldatu egingo dela habitatak edo urtaroak eragiten dituzten ingurumen-estres ezberdinak murrizteko estrategia gisa.

Hortaz, helburu zehatzak honakoak izan dira:

- Ezagutzea nola aldatzen diren oskolaren dimentsioak *Mytilus galloprovincialis* muskuiluen bi azpipopulazioetan (mareazpiko eta mareartekoa populazioak) eta bi urte-sasoietan (maiatzean eta azaroan).
- Aztertzea oskol-dentsitatearen aldakuntza bi muskuilu-azpipopulazioetan (mareazpiko eta mareartekoa populazioak) eta bi urte-sasoietan (maiatzean eta azaroan).

3. Ikerketaren muina

3.1. Esperimentuaren diseinua

Bi laginketa egin ziren muskuiluak *(Mytilus galloprovincialis)* batzeko Plentziako ertz harritsu babestu batetatik, bat etorriz udazkenarekin (2021 –eko azaroa) eta udaberriarekin (2022 –ko maiatza). Laginketa bakoitzean, muskuiluak itsasbeheran hartu ziren (marea bizietan) bi marea-eremutatik: mareartekoa (n = 30) eta mareazpiko (n = 30) populazioetatik, barnean hartuz ahalik eta tamaina-heinik zabalena. Horrela, lau esperimentu-talde lortu ziren: M_A (maiatzeko mareazpikoak), M_M (maiatzeko mareartekoak), A_A (azaroko mareazpikoak), A_M (azaroko mareartekoak).

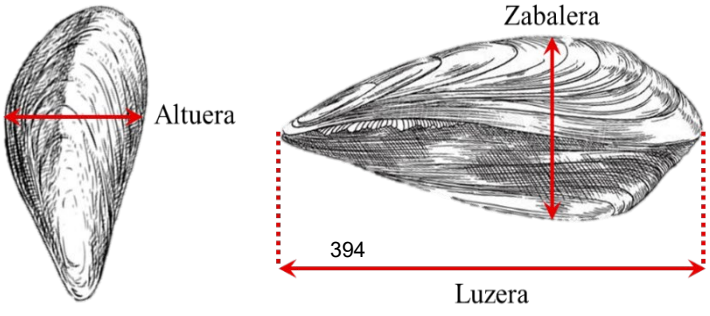
Biometriak neurtu eta oskol azalerak kalkulatu ziren esperimentu-talde bakoitzeko 30 muskuiluetan. Oskolen aurre-atzeko ardatza (luzera), ardatz dortso-bentrala (zabalera) eta alboko ardatza (altuera) neurtu ziren 0.01 mm hurbilera kalibre digitalak erabiliz (1. Irudia). Azalera (SA: mm^2) Reimer eta Tedengren (1996) jarraituz eskuratu zen:

$$SA = L \cdot (H^2 + W^2)^{0.5} \cdot 0.5\pi$$

non L, H eta W luzera (mm), altuera (mm) eta zabalera (mm) diren, hurrenez hurren. Oskolen pisu lehorrak lortu ziren behin muskuiluak sakrifikatu, disekzionatu eta garbitu ostean, oskola aire tenperaturan sikatuz. Oskolak 0.01 mg doitasuneko balantzan pisatu ziren.

Dimentsio-ezberdintasunak zuzentzeko, transformazio logaritmikoa erabili zen oskol pisua eta oskol luzeren arteko erregresioak eraikitzeko; ostera, logaritmizatu gabeko datuak erabili ziren oskol azalera, pisua, zabalera, altuera eta luzeraren arteko erregresio desberdinak eraikitzeko. Ordinal karratu txikienen erregresio-analisiak erabili ziren ezagutzeko erregresio bakoitzari zegozkion berretzaile alometrikoak eta elebazioak. Erregresio bakoitzaren malda zein elebazioen arteko ezberdintasun esanguratsuak ezagutzeko, kobariantza prozedurak erabili ziren (ANCOVA), Zar –en (2010) deskribatuta ageri direnak.

1. irudia. Muskuilu-oskolen dimentsioen izenak: aurre-atzeko ardatza (luzera), ardatz dortso-bentrala (zabalera) eta alboko ardatza (altuera)



3.2. Emaitzak

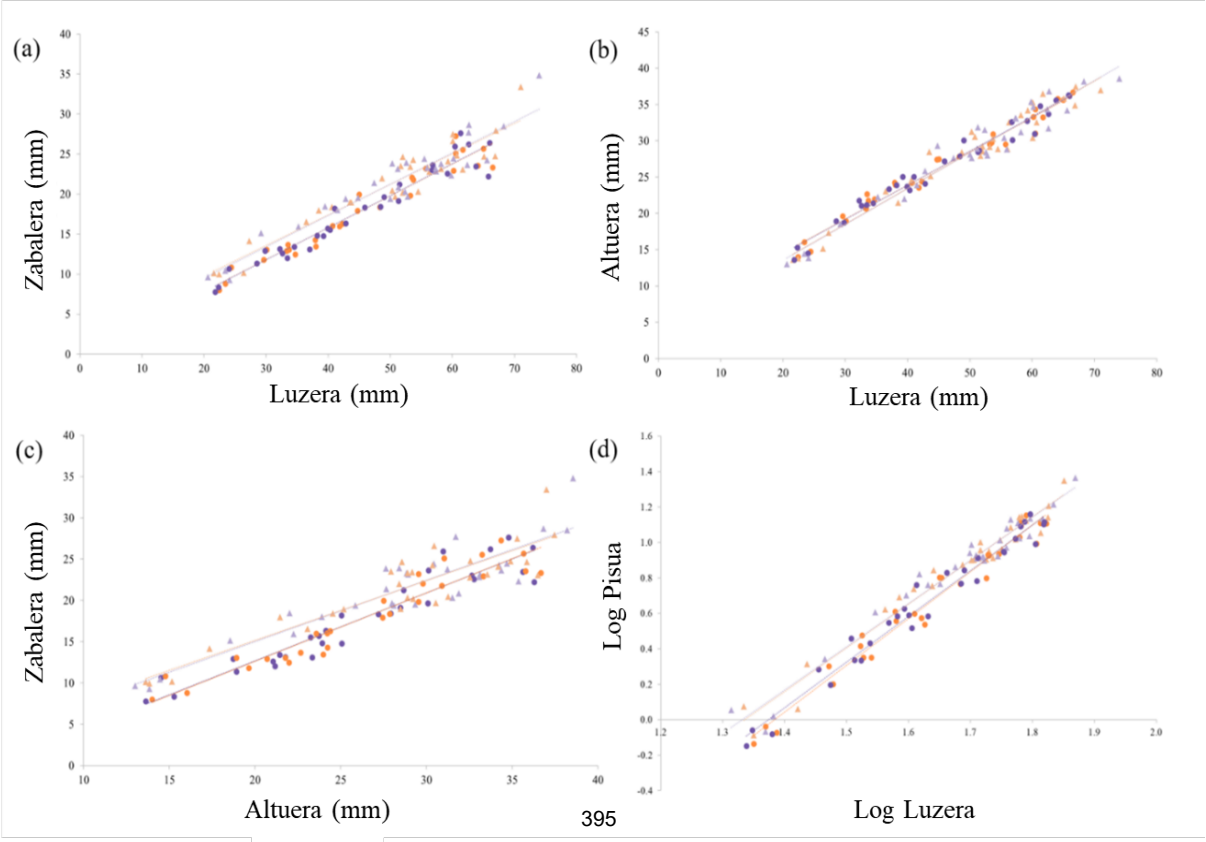
Zabalera vs. luzera. 2. Irudian (a) ageri dira, esperimentu-talde bakoitzeko, indibiduo bakoitzaren oskol-zabalerak dagozkien oskol-luzeren funtzio gisa. 1. Taulan (a) adierazi dira funtzio horien ondoriozko ekuazioak. Ez ziren ezberdintasun estatistikoki esanguratsurik aurkitu erregresio zuzenen malden artean; hortaz, malda amankomun bat eskuratu zen (b_c = 0.393). Aldiz, elebazioen balioak altuagoak ziren marearteko muskuiluetan, urtaroa edozein zelarik ere (F = 10.999, 110; p < 0.001; 2. Taula,a).

Altuera vs. luzera. 1. Irudian (b) irudikatu dira esperimentu-talde bakoitzeko, muskuilu bakoitzaren oskol-altuerak dagozkien oskol-luzerekiko. 1. Taulan (b) adierazi dira funtzio horien ondoriozko ekuazioak. Ez ziren ezberdintasunik aurkitu ez malden ez eta elebazioen artean, erregresio amankomun bat gertatuz (R^2 = 0.959; p < 0.001; F = 2687.46), 0.479 (± 0.009) –ko malda batekin eta 4.539 (± 0.457) balioa duen elebazioarekin.

Zabalera vs. altuera. 1. Irudian (d) ageri dira, esperimentu-talde bakoitzeko, indibiduo bakoitzaren oskol-zabalerak dagozkien oskol-luzeren funtzio gisa. 1. Taulan (d) adierazi dira funtzio horien ondoriozko ekuazioak. Malda amankomun bat eskuratu zen (b_c = 0.776) ez baitziren ezberdintasun esanguratsurik aurkitu lau erregresioen malden artean. Berriz ere, elebazioen balioak altuagoak izan ziren marearteko muskuiluetan, neurtutako urtaro bietan (F = 11.436, 110; p < 0.001; 2. Taula,b).

Pisua vs. luzera. 1. Irudian (e) ageri dira, esperimentu-talde bakoitzeko, indibiduo bakoitzaren oskol-pisuak dagozkien oskol-luzeren funtzio gisa. 1. Taulan (d) adierazi dira funtzio horien ondoriozko ekuazioak. Ez ziren ezberdintasun estatistikoki esanguratsurik aurkitu erregresio zuzenen malden artean; hortaz, malda amankomun bat eskuratu zen (b_c = 2.531). Aldiz, elebazioen balioak altuagoak ziren marearteko muskuiluetan, urtaroa edozein zelarik ere (F = 12.281, 110; p < 0.001; 2. Taula,e).

2. irudia. $Y = a \cdot X^b$ (Y: dimentsioa; a: elebazioa; X: dimentsioa; b: malda) funtzioa jarraitzen duten alometria-erlazioentzako erregresio lerroak. Ikur more (maiatza) eta laranjek (azaroa) urtaroak bereizten dituzte, borobil (mareazpiko) eta hirukiek (marearteko) marea-eremuak adierazten dituzten bitartean. a) indibiduo bakoitzaren oskol zabalera (mm) *vs.* oskol luzerak (mm); b) indibiduo bakoitzaren oskol altuera (mm) *vs.* oskol luzerak (mm); c) indibiduo bakoitzaren oskol zabalera (mm) *vs.* oskol altuerak (mm); eta d) indibiduo bakoitzaren logaritmizatutako oskol pisuak (mm) *vs.* oskol luzera logaritmizatuak (mm).



Azalera vs. pisua. Oskol bakoitzaren azalera indibidualak irudikatuta ageri dira 2. irudian pisuarekiko funtzio gisa. Erregresio bakoitzeko ekuazioak 3. Taulan (a) ikus daitezke. Malda bakoitza bestearekiko ezberdin suertatu zen (3. Taula, b), beherakako ordenan: mareazpikoak azaroan, mareartekoak azaroan, mareartekoak maiatzean, mareazpikoak maiatzean.

1. taula. Oskol (a) zabalerak eta (b) altuerak luzerarekiko funtzioari dagozkion erlazio alometrikoak, bai (c) oskol zabalerak altuerarekiko duen erlazioa, honako adierazpenaren arabera: $Y = a \cdot X^b$ (Y: dimentsioa; a: elebazioa; X: dimentsioa; b: malda).

a)

Urtaroa	Marea-eremua	n	a (± SD)	b (± SD)	R^2	p	F
Azaroa	Mareazpiko	28	- 0.098 (± 0.87)	0.397 (± 0.02)	0.947	< 0.001	460.773
	Marearteko	30	2.147 (± 1.29)	0.381 (± 0.03)	0.894	< 0.001	235.346
Maiatza	Mareazpiko	30	- 0.215 (± 0.87)	0.401 (± 0.02)	0.942	< 0.001	454.660
	Marearteko	30	1.654 (± 1.30)	0.392 (± 0.03)	0.898	< 0.001	246.304

b)

Urtaroa	Marea-eremua	n	a (± SD)	b (± SD)	R^2	p	F
Azaroa	Mareazpiko	28	5.266 (± 0.71)	0.466 (± 0.02)	0.973	< 0.001	936.079
	Marearteko	30	3.722 (± 1.16)	0.493 (± 0.02)	0.946	< 0.001	486.386
Maiatza	Mareazpiko	30	5.073 (± 0.68)	0.470 (± 0.02)	0.987	< 0.001	1022.59
	Marearteko	30	3.604 (± 1.18)	0.496 (± 0.02)	0.972	< 0.001	479.127

c)

Urtaroa	Marea-eremua	n	a (± SD)	b (± SD)	R^2	p	F
Azaroa	Mareazpiko	28	- 3.888 (± 1.35)	0.827 (± 0.05)	0.909	< 0.001	270.969
	Marearteko	30	0.686 (± 1.83)	0.724 (± 0.06)	0.822	< 0.001	134.498
Maiatza	Mareazpiko	30	- 3.796 (± 1.36)	0.824 (± 0.05)	0.951	< 0.001	263.941
	Marearteko	30	0.207 (± 1.82)	0.741 (± 0.06)	0.901	< 0.001	142.682

d)

Urtaroa	Marea-eremua	n	a (± SD)	b (± SD)	R^2	p	F
Azaroa	Mareazpiko	28	- 3.662 (± 0.16)	2.645 (± 0.10)	0.967	< 0.001	772.818
	Marearteko	30	- 3.287 (± 0.15)	2.460 (± 0.09)	0.964	< 0.001	754.431
Maiatza	Mareazpiko	30	- 3.542 (± 0.14)	2.580 (± 0.09)	0.967	< 0.001	852.559
	Marearteko	30	- 3.258 (± 0.15)	2.444 (± 0.09)	0.964	< 0.001	754.478

2. Irudia. Erregresio zuzenen elebazioen arteko askotariko alderaketan lortutako q-estadistikoaren balioekin eraikitako *Post hoc* taulak. a) Zabalera *vs.* luzera; b) Zabalera *vs.* altuera; d) Pisua *vs.* luzera. Ezberdintasun esanguratsuak ($p < 0.05$) izartxo baten bitartez adierazi dira.

a)

	A_M	M_A	M_M
A_A	4.550*	0.062	4.638*
M_M	0.089	4.555*	
M_A	4.644*		

b)

	A_M	M_A	M_M
A_A	4.259*	0.000	4.318*
M_M	0.058	4.384*	
M_A	4.325*		

d)

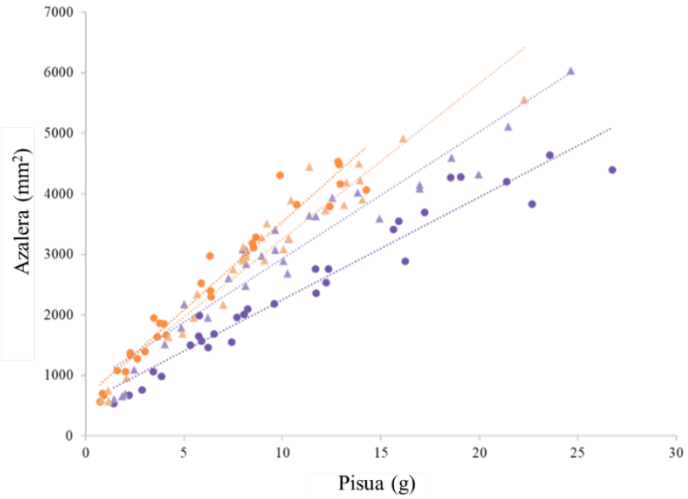
	A_M	M_A	M_M
A_A	5.307*	0.786	5.393*
M_M	0.085	4.689*	
M_A	4.602*		

3.3. Eztabaida

Lan honetan ageri diren datuek marea-eremuak eragina badaukala oskolaren alometrian adierazten dute. Marearteko muskuiluek ia % 7 –ko barrunbe handiagoa dute oskolen artean mareazpiko muskuiluekin alderatuta. Hau da, marearteko muskuiluek oskol forma borobilagoa agertzen dute, mareazpikoen oskolak zapalagoak direlarik. Proportzio horiek ez dira aldatzen muskuiluak tamainan hazi ahala edota urtaro batetik bestera, iradoki dezakeenak oskol fenotipo ezberdin horiek onuragarriak direla bai muskuilu txiki zein handientzako, baita urteko sasoi ezberdinetan zehar. Jakina da ingurumen baldintzek moluskuen oskola-dimentsioen gain eragina

daukatela (Clark *et al.*, 2020), nahiz eta, *M. galloprovincialis* muskuiluen kasuan, olatuekiko esposizioak duen eragina izan den azterketa-faktore bakarra oraingoz. Babarro eta Carrington –

3. irudia. $Y = a \cdot X^b$ funtzioa jarraitzen duten alometria-erlazioentzako erregresio lerroak, oskolen azalera eta oskolen pisuarekiko alderatuz. Ikur more (maiatza) eta laranjek (azaroa) urtaroak bereizten dituzte, borobil (mareazpiko) eta hirukiek (mareartеko) marea-eremuak adierazten dituzten bitartean.



3. taula. a) Oskol pisuak oskol azalerekiko (mm^2) funtzioari dagozkion erlazio alometrikoak, honako adierazpenaren arabera: $Y = a \cdot LW^b$. b) ANCOVA eta post hoc test-ak oskol azalera vs. oskol pisuaren arteko erlaziorako. Ezberdintasun estatistikoak izartxo batekin adierazi dira.

a)

Urtaroa	Marea-eremua	n	a (± SD)	b (± SD)	R^2	p	F
Azaroa	Mareazpiko	28	636.77 (± 96.96)	289.65 (± 13.06)	0.948	< 0.001	492.136
	Mareartеko	30	687.65 (± 134.82)	256.84 (± 13.32)	0.927	< 0.001	371.800
Maiatza	Mareazpiko	30	553.10 (± 103.24)	169.52 (± 7.87)	0.941	< 0.001	464.281
	Mareartеko	30	835.37 (± 137.38)	209.66 (± 11.56)	0.919	< 0.001	329.049

b)

	A_M	**M_A**	**M_M**
A_A	4.259*	0.000	4.318*
M_M	0.058	4.384*	
M_A	4.325*		

ek (2013) oskol baxu eta zabalagoak aurkeztu zituzten babesgabetutako inguruneentzako, olatuek eragin dezaketen dislokazioaren aurreko defentsa-mekanismo gisa. Steffani eta Branch –ek (2003) oskol baxuagoak ikusi zituzten baita ingurune babestugabean, baina estuagoak. Ikerketa honetan, muskuilu guztiak batu ziren ertz harritsuko eremu babestu berdinetik eta, hala eta guztiz ere, oskolen arteko hutsunea esangarriki ezberdina da. Haatik, oskol altuera, alegia, oskol estu edo zabalagoa izatea, ez zen aldatzen marea-eremuen artean, eremu babestuen adierazle (Babarro *et al.*, 2020).

Oskolen arteko hutsune handiago batek ekidite-estrategia bezala joka lezake mareartеko indibiduoetan, bai lehortzearen aurka zein tenperatura-estresaren kontra, baita hipoxiaren aurkako mekanismo gisa. Izan ere, topatu da oskol altuko lapek ur-galera txikiagoa agertzen dutela (Nuñez *et al.*, 2018), bai eta konbekzio bitarteko bero-galera handiagoa ere (Harley *et al.*, 2009). Hutsune zabalago batek baita eskaintzen du aire-erreserbarako gunea handitzeko aukera itsabeherako aire-espozizioan. Mantuko barrunbean ura harrapatzea estrategia tipikoa da itsasbeheran oxigeno-iturri bat izan ahal izateko (Zippay eta Helmuth, 2012). Ez hori bakarrik, oskol altuko ekotipo bat deskribatu da lapetan hipoxiaren aurrean bizirauteko hobeto moldatuta dagoena (Weihe and Abele, 2008).

Oskol-barrunbe handiago batekin batera, marearteko muskuiluen oskola sistematikoki pisutsuagoa da, edozein delarik ere urtaroa. Oskolaren dentsitatea (azalera *vs.* pisua), alabaina, bai aldatzen dela: bi populazioen oskolek azalera gutxiago dute masa unitateko maiatzean azaroan baino, nahiz eta urtaro bakoitzaren baitan banaketa ezberdinarekin marea-eremuen arabera. Hala, oskol-pisu komun baterako (10 g), marearteko muskuiluek % 9 –ko oskol dentsoagoa daukate azaroan; aldiz, maiatzean, mareazpiko muskuiluak dira % 24 –ko oskol dentsoagoak aurkezten dutenak. Populazioen oskolen bataz besteko dentsitatearen aldaketak azaldu daitezke bai oskol-konposizioaren aldakuntza bezala, edo oskolaren loditasunaren bariazio bezala, baita bi faktore horien aldibereko aldaketa bat bezala ere.

Oskolen dentsitatea txikiagoa izatea azaroan lotuta egon daiteke gazitasun ezberdintasunarekin, oskol-eraikuntzaren bultzatzaile nagusitzat hartzen den faktorea (Clark *et al.,* 2020). Gazitasun balio baxuek pH eta $CaCO_3$ asetasun-egoera baxuagoak dakartzate, kaltzio ioiak gutxitzen dituena eta kaltzifikazioan erabiltzen den karbono inorganikoaren eskuragarritasuna txikitzen duena (Miller *et al.,* 2009). Izatez, oskol konposizioan aldaketak gertatzen dira pH baxuetan, kaltzita geruzak handitu eta aragonita geruzak txikitzen baitira (Fitzer *et al.,* 2014), oskolaren dentsitatea txikiagotzea dakartzana. Euskal Meteoreologia Agentziak erregistratutako datuen arabera, 2021 –eko azaroa bereziki hezea izan zen, eurite masiboak jazo zirela hilabete osoan zehar (Euskalmet, 2021), estuarioko gazitasuna jaistea eragingo zuena. Hala ere, gazitasun faktorea gehiago aztertu beharko litzateke, gazitasun aldaketa puntualen efektu hau ulertuko badira (Babarro *et al.,* 2020).

Baita, bi hilabeteen arteko dentsitate desberdintasunak, muskuiluen hazkuntzaren adierazle ere izan daitezke, luzetara gehiago haziko balira udan eta loditara neguan. Udaberri bukaeran eta udan, elikadura-eskuragarritasun handiago baten ondorioz luzetarako hazkuntza handiagoa da, murriztu egiten dena neguan zehar janari eskasia dela eta. Fenomeno hori are nabarmenagoa liteke mareazpiko muskuiluetan, denboraldi luzeagotan elikatu baitaitezke eta, hortaz, gehiago hazi, oskol finenak garatuz. Ostera, maiatzean, mareazpiko muskuiluak dira oskol dentsoenak dituztenak, karramarroen harrapakaritzaren aurreko erantzuna izan litekeena (Freeman, 2007), aktiboago izan ohi direnak uda aldean (Hunter eta Naylor, 1993; Aagaard *et al.,* 1995).

4. Ondorioak

Populazioaren jatorriak eragin handia dauka muskuiluek garatzen duten oskol formaren gain, egokitzapen morfologiko espezifiko bat suertatzen dena marearteko habitat gogorrera moldatzeko. Oskol dentsitatea, aldiz, urtaroaren arabera aldatzen den faktore bakarra izan da. Oskol sendoagoak erregistratu ziren maiatzean, neguan zeharreko hazkuntza-tasa geldoago edota gazitasun ezberdintasunen isla izan daitezkeenak. Lortutako emaitzek ahalbidetzen dute *M. galloprovincialis* –en hazkuntza ulertzea, ez bakarrik muskuilu energetikan aplikatu ahal izateko, baita muskuiluaren edozein ikerketari begira, hala nola, akuikulturan, ekologian eta ingurumen-toxikologian.

5. Etorkizunerako planteatzen den norabidea

Ikerketa hau *in situ* esperimentuetarako abiapuntutzat jo da, alegia, zelai-esperimentuetan hazkuntza-tasa ezberdineko indibiduoen profilak aztertzeko, ingurumen-baldintzek inposa lezaketen efektuak barne. Datu hauek ikuspuntu oso baliagarria ematen digu muskuiluaren fisiologia aztertzeko; esate baterako, tamainak oxigeno kontsumoan duen eragina ulertuz.

6. Erreferentziak

Aagaard, A., Warman, C. G. eta Depledge, M. H. (1995). Tidal and seasonal changes in the temporal and spatial distribution of foraging *Carcinus maenas* in the weakly tidal littoral zone of Kertminde Fjord, Denmark. *Marine Ecology Progress Series, 122,* 165–175. https://www.int-res.com/abstracts/meps/v122/p165-172/

Akester, R. J. eta Martel, A. L. (2000). Shell shape, dysodont tooth morphology, and hinge-ligament thickness in the bay mussel Mytilus trossulus correlate with wave exposure. *Canadian Journal of Zoology, 78,* 240-253. https://cdnsciencepub.com/doi/abs/10.1139/z99-215

Alunno-Bruscia, M., Bourget, E. & Fréchette, M. (2001). Shell-allometry and length-mass-density relationship for *Mytilus edulis* in and experimental food-regulated situation. *Marine Ecology Progress Series, 219,* 177-188. https://www.int-res.com/abstracts/meps/v219/p177-188/

Babarro, J. M. F. eta Carrington, E. (2011). Byssus secretion of Mytilus galloprovincialis: effect of site at macro- and micro-geographical scales within Ría de Vigo (NW Spain). *Marine Ecology Progress Series, 435,* 125-140. https://www.int-res.com/abstracts/meps/v435/p125-140/

Babarro, J. M. F. eta Carrington, E. (2013). Attachment strength of the mussel *Mytilus galloprovincialis:* effect of habitat and body size. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 443,* 188-196. https://doi.org/10.1016/j.jembe.2013.02.035

Babarro, J. M. F., Filgueira, R., Padín, X. A. eta Portabales, M. A. L. (2020). A novel index of the performance of *Muytilus galloprovincialis* to improve comercial exploitation in aquaculture. *Frontiers in Marine Science, 7,* 719. https://doi.org/10.3389/fmars.2020.00719

Burnett, N. P. eta Belk, A. (2018). Compressive strength of *Mytilus californianus* shell is time-dependent and can influence the potential foraging strategies of predators. *Marine Biology, 165,* 42. https://link.springer.com/article/10.1007/s00227-018-3298-y

Clark, M. S., Lloyd, S. P., Arivalagan, J., Backeljau, T., Berland, S., Cardoso, J. C. R., …, Harper, E. M. (2020). Deciphering mollusc shell production: the roles of genetic mechanisms through to ecology, aquaculture and biomimetics. *Biological reviews, 95,* 1812-1837. https://doi.org/10.1111/brv.12640

Fitzer, S. C., Zhu, W., Tanner, K. E., Phoenix, V. R., Kamenos, N. A. eta Cusack, M. (2014). Ocean acidification alters the material properties of *Mytilus edulis* shells. *Journal of the Royal Society Interface, 12*, 20141227. https://doi.org/10.1098/rsif.2014.1227

Freeman, A. S. (2007). Specificity of induced defenses in *Mytilus edu*lis and asymmetrical predator deterrence. *Marine Ecology Progress Series, 334*, 145-153. https://www.int-res.com/abstracts/meps/v334/p145-153/

Gardner, J. P. A. eta Thomas, M. L. H. (1987). Growth, mortality and production of organic matter by a rocky intertidal population of *Mytilus edulis* in the Quoddy Region of the Bay of Fundy. *Marine Ecology Progress Series, 39,* 31-36. https://www.jstor.org/stable/24825643

Harley, C. D. G., Denny, M. W., Mach, K. J. eta Miller, L. P. (2009). Thermal stress and morphological adaptations in limpets. *Functional Ecology, 23,* 292-301. https://www.jstor.org/stable/40205532

Hawkins, A. J. S. eta Bayne, B. L. (1985). Seasonal variation in the relative utilization of carbon and nitrogen by the mussel *Mytilus edulis:* budgets, conversion efficiencies and maintenance requirements. *Marine Ecology Progress Series, 25,* 181-188. https://www.int-res.com/articles/meps/25/m025p181.pdf

Hunter, E. eta Naylor, E. (1993) Intertidal migration by the shore crab *Carcinus maenas*. *Marine Ecology Progress Series, 101,* 131–138. https://www.int-res.com/articles/meps/101/m101p131.pdf

Kirk, M., Esler, D. & Boyd, W. S. (2007). Morphology and density of mussels on natural and aquaculture structure habitats: implications for sea duck predators. *Marine Ecology Progress Series, 346,* 179-187. https://www.int-res.com/abstracts/meps/v346/p179-187/

Márquez, F., NietoVilela, R. A., Lozada, M. & Bigatti, G. (2015). Morphological and behavioral differences in the gastropod *Trophon geversianus* associated to distinct environmental conditions, as revealed by a multidisciplinary approach. *Journal of Sea Research, 95,* 239-247. https://doi.org/10.1016/j.seares.2014.05.002

Miller, A. W., Reynolds, A. C., Sobrino, C. eta Riedel, G. F. (2009). Shellfish face uncertain future in high CO2 world: influence of acidification on oyster larvae calcification and growth in estuaries. *PLoS One, 4*, e5661. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005661

Nuñez, J.D., Iriarte, P.F., Ocampo, E.H., Madrid, E. eta Cledón, M. (2018). Genetic and morpho-physiological differentiation in a limpet population across an intertidal gradient. *Helgoland Marine Research, 72*, 16. https://doi.org/10.1186/s10152-018-0519-1

Penney, R. W., Hart, M. J. eta Templeman, N. D. (2006). Shell strength and appearance in cultured blue mussels *Mytilus edulis, M. trossulus,* and *M. edulis* x *M. trossulus. North American Journal of Aquaculture, 69,* 281-295. https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1577/A06-044.1

Reimer, O. eta Tedengren, M. (1996). Phenotypical improvement of morphological defences in the mussel *Mytilus edulis* induced by exposure to the predator *Asterias rubens. Oikos, 75,* 383-390. https://doi.org/10.2307/3545878

Steffani, C. N. eta Branch, G. M. (2003). Growth rate, condition and shell shape of *Mytilus galloprovincialis:* responses to wave exposure. *Marine Ecology Progress Series, 246,* 197-209. https://www.int-res.com/abstracts/meps/v246/p197-209/

Zar, J. H. (2010). *Biostatistical Analysis, 5th Edition.* Prentice Hall arg.

Zippay, M. L. eta Helmuth, B. (2012). Effects of temperature change on mussel, *Mytilus. Integrative Zoology, 7,* 312-327. https://doi.org/10.1111/j.1749-4877.2012.00310.x

7. Eskerrak eta oharrak

Ikerketa hau Eusko Jaurlaritzak babestu du Ikerketa-talde kontsolidatuen bitarteko diru-laguntzarekin (CBET group, IT810-B) bai eta Maitane Pérez-Cebrecos –i emandako doktoretza-aurreko diru-laguntzaren bitartez. Deskribatzen den lana Maitane Pérez-Cebrecos –en tesiaren kapitulu bateko atal bati dagokio.

Nobel Saridun Klik erreakzioaren baliagarritasuna konposatu biologikoak eransteko polimero gainazalean

Julia Sánchez Bodón[1] Ane García García,[1] Maria Diaz Galbarriatu,[1] Ana Catarina Lopes,[1,2] Isabel Moreno,[3] José Luis Vilas Vilela[1,4]

[1]Kimika Makromolekularreko Laborategia, Kimika Fisikoa Saila, ZTF/FCT, UPV/EHU, [2]IKERBASQUE, Basque Foundation for Science, Leioa, [3]Kimika Makromolekularreko Laborategia, Kimika Organikoa eta Inorganikoa Saila, ZTF/FCT, UPV/EHU, [4]Basque Center for Materials, Applications and Nanostructures, Bizkaiko Zientzia eta Teknologia Parkea
julia.sanchez@ehu.eus

Laburpena

Azken urteetan, hezur edo artikulazio akastunen funtzioa berrezartzeko inplante kirurgikoak erabiliak izan ohi dira. Halaber, azken urteetan inplanteen osteointegrazio ona bermatzen duten materialak lortzea erronka zientifikoa bihurtu da. Izan ere, biomaterialaren gainazalaren propietate fisiko kimikoek pazientearen erantzuna modulatzen dute. Hori dela eta, funtsezkoa da aktibitate antiinflamatorioa eta bakterioen aurkako propietateak dituzten inplanteak diseinatzea. Azken hamarkadan Klik kimika aukera interesgarria bilakatu da biomolekula konplexuak material desberdinen gainazaletara kobalenteki lotzeko. Lan honetan biomedikuntzan interesa duen molekula organiko baten inmobilizazio kobalentea deskribatzen da poliazido L-laktikoa (PLLA) polimeroa gainestaldura gisa erabiliz. Proposatutako metodologiaren berrespena Ultramore-ikuskor (UM-Ikus), mikroskopia fluoreszentea, X izpien espektroskopia fotoelektronikoa (XPS) eta angelu kontaktuaren bidez balidatu da.

Hitz gakoak: polimeroa, gainestaldura, klik erreakzioa

Abstract

Surgical implants are usually employed to restore the function of affected joints or bones. In recent years, obtaining materials that guarantee good implant osseointegration has become a scientific challenge. In fact, the physico-chemical properties of the surface of the biomaterial play a keyrole in patience response. Therefore, it is essential to design implants with anti-inflammatory activity and antibacterial properties. In the last decade, click chemistry has emerged as the method of choice in order to bind covalently complex biomolecules to the surface of diverse materials. This work describes the covalent immobilization of an organic molecule with interest in biomedicine using Poly-L-Lactic acid (PLLA) polymer as a coating. The validation of the proposed methodology has been assured with different techniques: UV-Vis, fluorescence microscopy, X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) and water contact angle.

Keywords: polymer, coating, click reaction

1. Sarrera eta motibazioa

Urtero milioi aldaka- eta 250,000 belaun-ordezkapen baino gehiago ematen dira mundu osoan zehar. Izan ere, ospitalizatutako gaixoen artean % 30 kateter baskular bat edo gehiago izaten dute (Arciolla eta Campoccia, 2018). Inplante kirurgiko baten ezarpenak erantzun tisular desberdinak eragiten ditu. Esaterako, inplanteak odolarekin kontaktuan jartzerakoan erantzun negatiboa sortarazi dezake, proteinen adhesioa eta odol-koagulazioa areagotuz. Inplantazioarekin batera hantura akutua sortzen da, kasu honetan neutrofiloak eta monozitoak, globulu zuri bezala ezagutzen direnak, hantura eman den lekuan adsorbatzen dira (Chandorkar, 2019). Ehunaren berrezarpena ematea posiblea ez den kasuetan, hasierako hantura prozesu akutua kronikoa bihur daiteke, kasu honetan ehunaren enkapsulazioa eman daiteke, inplante akastuna lortuz.

Mikroorganismo, zelula eta proteinen adsortzioa gainazalak azaltzen dituen propietateen araberakoa da, adsortzioa kontrolaezina denean infekzioa sor daiteke, zeina hantura eta odol-koagulazioak eragiten dituen. Osasun arazo hauek saihesteko helburuarekin propietate antiinflamatorio eta bakterioen aurkako aktibitateak dituen inplanteak diseinatzea ezinbestekoa da. Horretarako, gainestaldurak eta gainazal eraldaketak bai fisikoak, hala nola, topografia edo

bapore-deposizioa, eta bai kimikoak, esaterako, plasma tratamendua edota erreakzio kimikoak, ezinbestekoak bilakatu dira (Rana, 2017; Sánchez-Bodón, 2020).

Gainestalduren artean, material polimerikoetan oinarritutako gainestaldurak gero eta interes handiagoa pizten ari dira arlo desberdinetan. Izan ere, haien erabilera biomaterial moduan izugarri zabala da industriatik paketatze aktiborako medikuntzara arte (Andrade-del Olmo, 2017). Polimero biodegradarriak, eta horien artean, poli-(azido *L*-laktikoa)-z (PLLA) estandar baliogarritzat har daiteke ingeniaritza birsortzaile ortopedikorako aplikazio askotarako, fabrikazioan duten aldakortasunagatik eta biomolekula eta zelulekiko duen bateragarritasun eta biodegradagarritasunagatik. Azido polilaktikoa etorkizun handiko polimero biodegradagarria da, lehengai naturaletatik eskuratzen baita, artoa, azukrea, arroza edo patata esaterako. Biodegradagarritasun eta biobateragarritasun bikainari esker, PLLAk gaitasun handia erakusten du aplikazio biomedikoetan, besteak beste, jostura kirurgikoetan, gainestaldura bezala edota farmakoak modu kontrolatuan askatzeko sistemetan.

Bestalde, eraldaketa kimikoei dagokienez, 2022an Kimikako Nobela irabazi duen klik kimika oso erabilgarria bilakatu da biomolekula konplexuak gainazal desberdinetara kobalenteki lotzeko aukera aurkezten duelako. Klik kimikaren barnean, kobrez katalizaturiko azida eta alkinoaren arteko erreakzioa ezagunena eta bereizgarriena da (Sharpless, 2001). Izan ere, erreakzio hau inguru tenperaturan gerta daiteke etekin kuantitatiboak lortuz eta konposatuaren aktibitate biologikoa bermatuz. Gaur egun, kimika mota hau eremu askotan erabiltzen da, ikerketa-laborategitik industriara arte; esate baterako, materialei ezaugarri jakinak emateko, hala nola, bakterioak hiltzea, elektrizitatea eroatea, eguzki-argia xurgatzea, etab., edo substantzia farmazeutiko berriak sortzeko. Izan ere, klik kimikaren oinarriak gero eta ate gehiago zabaltzen ditu. Hori dela eta, lan honetan molekula fluoreszentea den inmobilizazio kobalentea deskribatzen da poliazido L-laktikoa (PLLA) gainestaldura gisa erabiliz eta azida eta alkinoaren arteko klik erreakzioa konbinatuz.

2. Arloko egoera eta ikerketaren helburuak

Lan honen helburua azida eta alkinoaren arteko klik erreakzioaren eraginkortasuna aztertzea da, PLLA gainazalean biologikoki aktiboak diren konposatuen inmobilizazioa suertatuz. Horretarako, PLLAren gainean eraldaketa kimiko desberdinak pairatuko dira: hidrolisia, amidazioa eta klik erreakzioa, hurrenez hurren. Ondoren, immobilizatutako konposatua aztertuko da zenbait teknika desberdin erabiliz: UM-ikuskor, mikroskopia fluoreszentea, XPS eta kontaktu angelua. Azkenik, proposatutako metodologiaren berrespena eztabaidatuko da.

3. Ikerketaren muina

Lehenengo, PLLAren sintesia aurkeztuko da. Ondoren, PLLAren gainean ematen diren erreakzioen, hidrolisia eta amidazio erreakzioa, prozedurak deskribatuko dira. Jarraian, proposatutako konposatuaren atxikipena burutuko da bi bide desberdin jarraituz. Azkenik, azterketa horietan lortutako emaitzak aztertu ondoren, prestatutako filmak biomedikuntza aplikazioetan egokiak diren edo ez zehaztuko da.

3.1 PLLA filmen prestaketa

Lehenik eta behin, granuluetan dagoen PLLA (1 g) kloroformotan (50 mL) disolbatzen da eta irabiatzen uzten da 2 h-z. Ondoren, nahasketa metanol destilatu hotzean hauspeatzen da. Lortzen den hauspeakin zuria hutsean lehortzen da 40 °C-tan. Behin lehor, filmak lortzeko asmoz, materiala bero dagoen prentsa hidrauliko batean sartzen da eta konpresioaren bidez filmak prestatzen dira. Bertan, laginak 10 minutuz 200 °C-tan mantentzen dira 0 bar presioarekin. Ondoren, 50, 100 eta 150 bar-tan uzten dira, minutu bakoitzeko. Azkenik, filmak zuzenean ur bainu baten hozten dira. Lortutako filmak 2x1 cm-tan mozten dira eta hurrengo funtzionalizaziorako prestatzen dira.

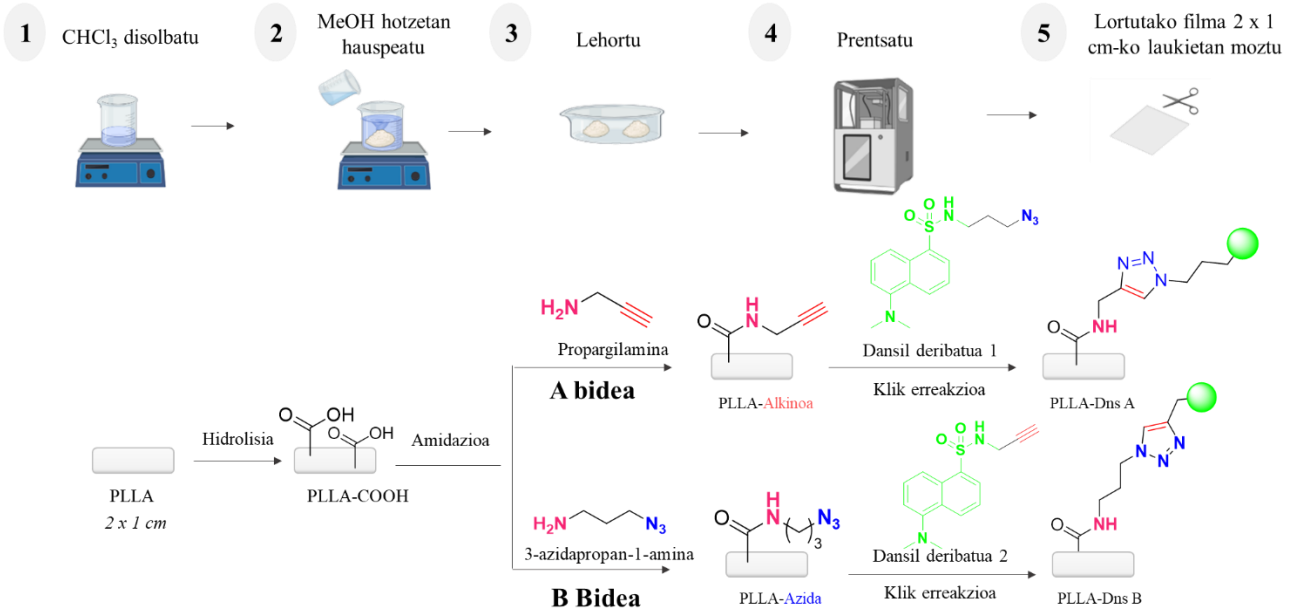
3.2 PLLA filmen gaineko eraldaketak

Filmak prestatu ondoren bi prozesu desberdin ematen dira: hidrolisia eta amidazio erreakzioa. Moztutako PLLA filmak metanol/ur 1:1 nahasketa batean garbitzen dira 3 aldiz sonikatuz ultrasoinuan. Behin ondo garbituta, lehortzen uzten dira 50 °C-tan. Ondoren, filmak NaOH (0,25 M) disoluzio batean murgiltzen dira 50 °C-tara 30 min-tan zehar 300 rpm irabiaketa konstantepean. Azkenik, ultrasoinuan, filmak HCl (% 10) disoluzioarekin garbitzen eta lehortzen dira hutsean 40 °C –tan.

Alkino edo azida taldea sartu baino lehen, amidazio erreakzioaren bidez, filmen aurre-aktibazioa burutu behar da. Horretarako, EDC·HCl (1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilkarboimida hidrokloruroa, 0,025 g) -eta NHS (*N*-hidroxisukzinimida, 0,015 g) pH=5,5 disoluzio tanpoian disolbatzen dira. Aktibatzaileak disolbatu ondoren, filmak disoluzioan murgiltzen sartzen dira eta irabiatzen uzten dira 4 h inguru tenperaturan. 4 h pasa ostean, bial berri batean murgiltzen dira EDC·HCl-rekin (0,028 g) berriro pH=5 duen tanpoi disoluzioarekin 2 h-z irabiatzen da 40 ºC-tan. 2 orduz irabiatzen egon eta gero, 24 orduz ingurune tenperaturan irabiatzen uzten da. Azkenik, urarekin garbitzen dira eta huts sistemara sartu dira 3 orduz, funtzionalizatutako filmak guztiz sikatzeko. Behin lehor, lehen amidazio erreakzioa gauzatzeko, filmak propargilaminan edo 3-azidapropan-1-aminan (2 bal.) disoluzioan murgiltzen dira inguru tenperaturan 24 h-z. Azkenik, urarekin garbitzen dira eta lehortzen uzten dira 24 h-z.

Azkenik, gainazala behin aktibatuta, dansil deribatuaren immobilizazioa burutzen da. Konposatu organiko honek, biomedikuntza arloan markatzaile zelular oso erabilia, fluoreszentzia mikroskopiaren bidezko erreakzioaren jarraipena egiteko aukera ematen du. Azida eta alkinoaren arteko erreakzioa burutzeko, dansil deribatua eraldatu egin behar da aurretiaz, hori dela eta beharrezkoa den talde funtzioarekin (azida edo alkino taldea) erreakzionarazten da. Behin dansil deribatua lortuta, kobrez katalizaturiko klik erreakzioa aurrera eramaten da.

1. Irudia. PLLA filmen sintesia deskribatzen duen metodologia eta PLLA filmen gaineko eraldaketak.



3.3 Emaitzak

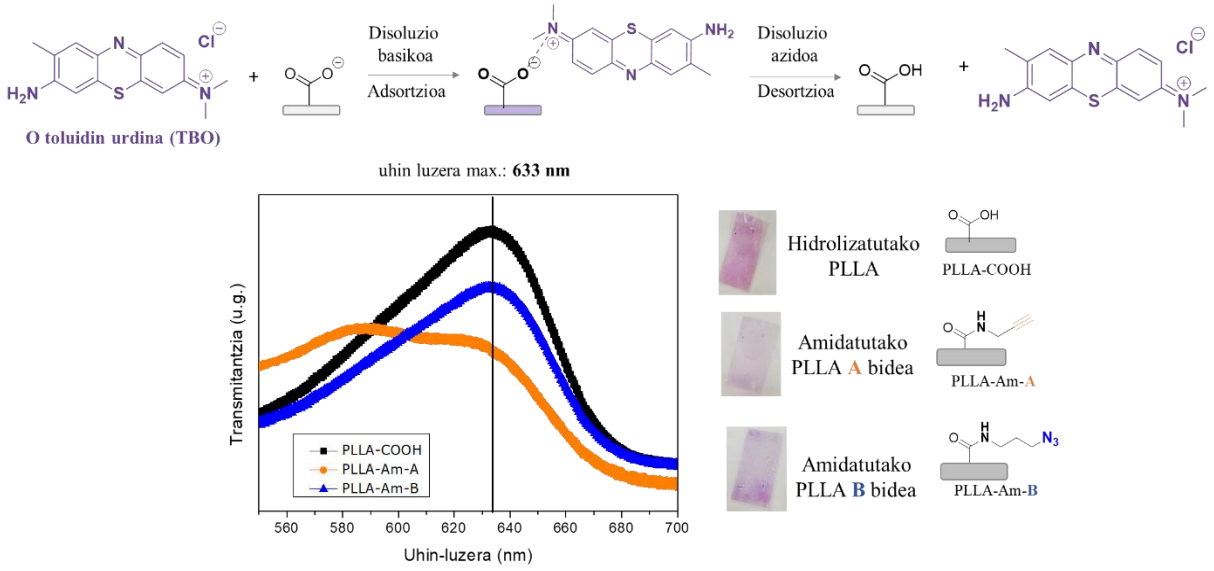
Klik erreakziorako beharrezkoa den alkino edo azida talde funtzionala PLLA gainazalera erantsi ahal izateko, aldez aurretik PLLA azido karboxilikoekin aktibatu behar da. Horretarako, PLLA filmen hidrolisia burutu behar da lehenik eta behin. Gainazalean eratzen diren azido karboxilikoen kantitatea kolorimetria metodoaren bidez kuantifikatu egin dira, amidazio erreakzioa gauzatu baino lehen eta amidazio erreakzioaren ostean aztertu egin baita azido

karboxilikoen kantitatea. Izan ere, modu honetan, erreakzionatutako azido karboxilikoen kopurua determina daiteke.

Kobrez katalizaturiko klik erreakzioan bi funtzio talde dira nagusi, amaierako alkinoa (karbono-karbono lotura hirokoitza) eta azida (hiru nitrogenodun molekula) taldea. Hori dela eta, bi amidazio bide alternatibo proposatu dira, gainazalean lortzen den amaierako talde funtzionalaren araberakoa izango dena, 1 irudian ikus daitekeen moduan.

PLLAren gainazalean sortu diren azido karboxilikoak karboxilato ioi moduan aurkituko dira pH basikoan TBOrekin nahasterakoan. Hori dela eta, TBO molekularen amonio ioiak karboxilato ioirekin elkar egingo du indar elektrostatikoen bidez, PLLA filma larrosa bihurtuz (2.irudia). Filmak disoluzio azido batean murgiltzerakoan, TBO askatu egiten da eta azido karboxilikoak berreskuratzen dira. Askatutako TBO UM-ikuskorraren bidez neurtzen da eta emandako absorbantzia aztertzen da. Horrela, aurretiaz garatutako kalibratuaz baliatuz, gainazalean adsorbatutako TBO kantitatea neurtuko da. Suposatuz TBOren mol bat azido karboxilikoaren mol batekin erreakzionatzen duela, gainazalean dauden azido karboxilikoen kopurua determinatzen da.

2. Irudia. Azido karboxilikoen eta TBOren arteko elkarrekintza eta disoluzio bakoitzaren UM-ikuskorraren espektroa.



Hidrolizatutako PLLAn, 633nm-tan lortutako absorbantziak, filmaren gainazalean eratutako azido karboxilikoen kantitatearekin zuzenki proportzionala da. Zenbat eta absorbantzia handiagoa izan, orduan eta azido karboxiliko gehiago eratu direla gainazalean adierazten du. Behin azido karboxilikoak eratuta, gainazalaren amidazio prozesua eman da. Kolorimetriaren bidez, erreakzionatu gabe gelditu diren azido karboxilikoak determinatu dira berriz ere. Horrela, amidatutako azido karboxilikoen portzentaia determinatu egin da. Propargilamina erabiliz, hots, A bidea jarraituz, non gainazalean gelditzen den talde funtzionala amaierako alkinoa den, absorbatutako TBO kantitatea txikiagoa da; beraz, amidatu gabe gelditu diren azido karboxiliko kantitatea txikiagoa da. Kasu honetan, A bidea jarraituz, azido karboxilikoen % 15 amidatu da. Aldiz, B bidea jarraituz, 3-azido-propan-1-amina erabiltzen denean, soilik % 7 amidazioa lortzen da

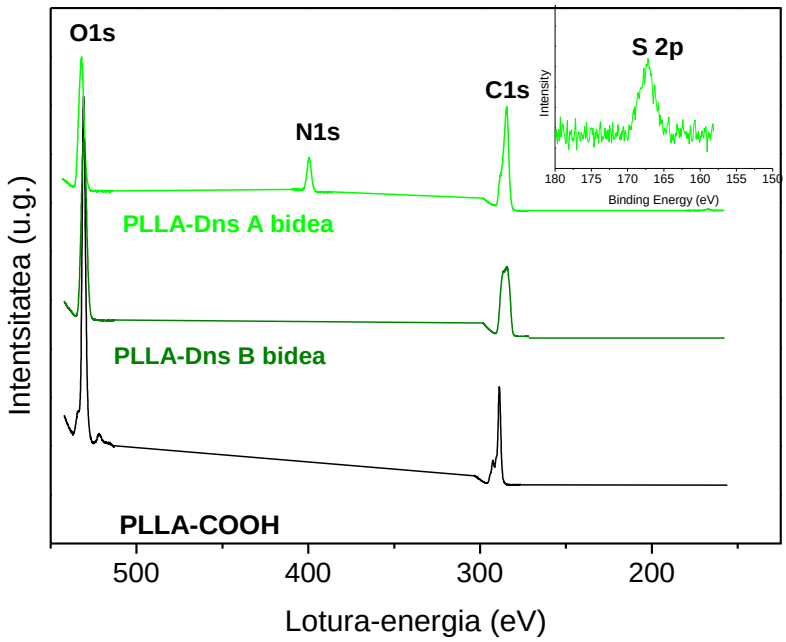
Amidazioa burutu ondoren, konposatu organikoaren immobilizazioa burutu da. Molekula organiko hau, dansil kloruroa, aurretiaz eraldatu egin behar da, klik erreakzioan parte hartzen duen taldea bere egituraren barnean izan dezan. Hori dela eta, bi dansil deribatu lortzen dira. Dansil deribatu hauek dagokien polimero gainazalarekin erreakzionarazi dira. Konposatu hau fluoreszentea denez, mikroskopia fluoreszentearen bidez behatu egin da dansil deribatuen atxikipena. 3. irudian ikus daitekeen moduan, hidrolizatutako PLLAk ez du fluoreszentziarik igortzen irradiatutako gunean. Aldiz, energia bera erabiltzen denean, A bidea jarraitutako

estrategian kolore berdeko fluoreszentzia behatzen da, eraldatutako fluoroforoari dagokiona. Bestaldetik, B bidean immobilizatutako dansil deribatuak ez du fluoreszentziarik igorri, energia kantitate bera erabili arren.

3. Irudia. PLLAren gaineko eraldaketak egin ondoren, mikroskopia fluoreszentearen bidez aztertutako fluoreszentzia.

Lortutako emaitza hauek XPSren bidez berretsi dira, eraldatutako film bakoitzaren gainazalaren analisi elementala behatuz. Hau da, gainazal bakoitzean dauden elementu desberdinak behatu egin dira. 4. irudian ikus daiteke hidrolizatutako PLLAk soilik bi banda nagusi aurkezten dituela, 285 eV eta 533 eV energian, karbono (C1s) eta oxigeno (O1s) elementuei dagozkiena, hurrenez hurren. Klik erreakzioaren ostean, A bidea jarraitutako eraldaketan, PLLA-Dns A dugu, eta film gainazal honetan karbono eta oxigenoaz gain, beste bi seinale hautematen dira, nitrogenoa (N1s) 395 eV-tan eta sufrea (S2p) 167 eV-tan. Bi seinale berri hauek gainazalean biokonjugatutako dansil konposatuari dagozkio. Ostera, B bidean erreakzionarazitako dansil konposatuak ez du seinale eraginkorrik erakutsi nitrogeno edo sufreari dagozkien lotura-energian. Beraz, mikroskopioarekin eta XPS-rekin lortutako emaitzen arabera, edonolako konposatua PLLA gainazalera biokonjugatzeko metodorik aproposena A bidea dela esan daiteke.

4. Irudia. Eraldatutako PLLA gainazal desberdin XPSren espektroa.



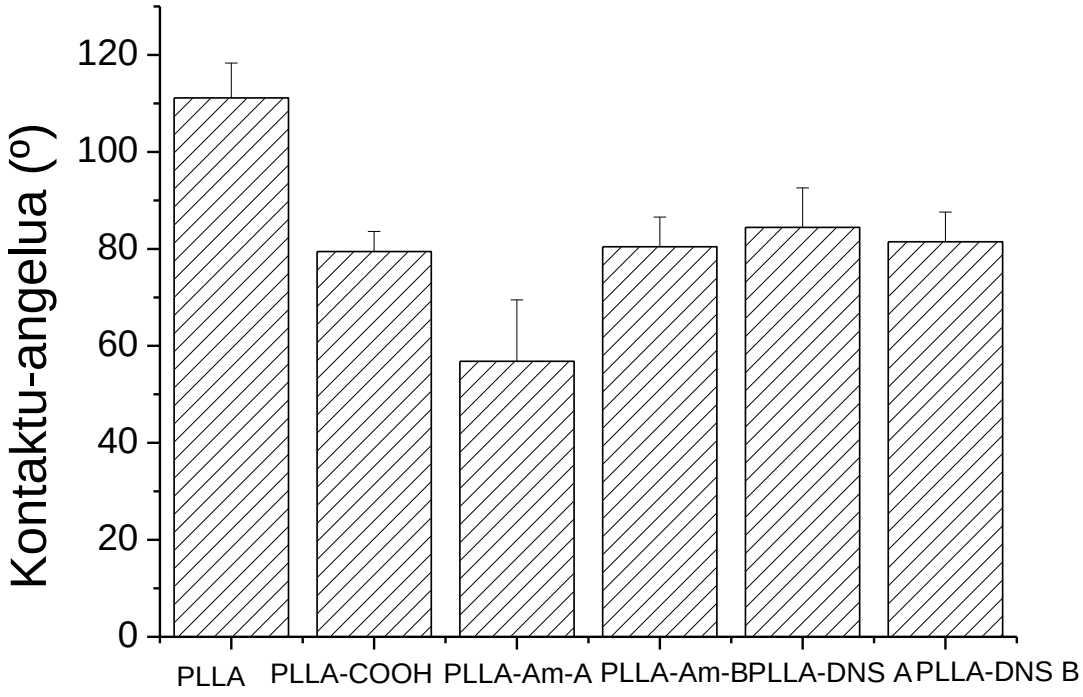
Bestaldetik, erreakzio bakoitzaren ostean, PLLA gainazalak pairatu dituen hidrofilia aldaketak behatu dira kontaktu angeluaren bidez. Hidrofilia gainazalak urarekin duen afinitatea definitzen du.

Gainazalaren hidrofilia faktore garrantzitsua da proteinen edota bakterioen atxikimendurako. Izan ere, gainazal hidrofiloago batek makrofagoen, bakterioen edota proteinen gehiegizko adsortzioa saihes dezake. Gainazala hidrofiliko bezala definitzeko gainazala eta ur tantaren arteko angelua 90 º baino txikiagoa izan behar da. 90 º baino handiagoa bada, gainazala hidrofoboa dela esan daiteke.

5. irudian ikus daitekeen moduan, eraldatu gabeko PLLAk 110 º-ko angelua erakusten du, nahiko hidrofoboa izanik. Oro har, PLLAren gainazalak talde funtzional polar gutxi aurkezten ditu eta oso zaila da edonolako konposaturik gainazalean itsastea, hori dela eta, PLLAren funtzionalizazioa beharrezkoa da. Hidrolisi prozesuaren ostean, angelua 78º-ra jaisten da gainazala hidrofiloagoa izanik, azido karboxilikoen (-COOH) talde funtzional polarren presentziaren ondorioz. Proposatutako bi amidazio bideren ondoren lortutako gainazalen angeluak nahiko desberdinak dira. A bidearen ondoren, angelua 48º-tara txikiagotzen da, nahiz eta lotutako talde funtzionalen polartasuna (alkinoa) txikiagoa izan. Balio hauek gainazalak duen zimurtasunarekin erlazionatzen dira. Izan ere, Wenzel teoriaren arabera, jadanik hidrofiloa den gainazala hidrofiloagoa bilakatzen da zenbat eta zimurragoa izan.

Bestetik, espero den bezala, ez da aldaketa esanguratsurik behatu B bidea jarraitu ondoren lortutako gainazalaren kontaktu angeluan, PLLA hidrolizatuaren azalerarekin konparatuz. Azkenik, dansil deribatuak PLLA gainazalera konjugatu ondoren lortutako angeluak nahiko antzekoak izan dira haien artean, 80-90º hain zuzen ere. Izan ere, A bidea jarraitzen duen estrategian, lortutako PLLA gainazalaren kontaktu angelua 48º-tik 80-90º-ra igotzen da gainazalaren hidrofilitatea txikituz, hau 1,2,3-triazolaren eta immobilizatutako konposatu aromatikoen eragina izan da. Aldaketa nabarmen honek ziurtatzen du beste teknikek adierazi dutena, hau da, klik erreakzioa gauzatzeko bide egokiena A dela.

5. Irudia. PLLAren gaineko eraldaketak egin ondorengo ur kontaktu angeluen balioak.



4. Ondorioak

Lan honetan azida eta alkinoaren arteko klik erreakzioaren baliogarritasuna frogatu egin da medikuntza interesa duen molekula organikoa immobilizatuz polimero baten gainazalean. Lehenik, erreakzioaren eraginkortasuna frogatu da fluoroforo batekin, non filmen gainazalaren amidazio erreakzioa burutu den eta ondorengo klik erreakzioa. Amidazio erreakzioaren eragikortasuna UM-Ikuskorraren bidez frogatu egin da. Ondoren, fluoroforoa erantsi da bi metodo desberdin jarraituz eta erreakzioaren jarrapeina eta eraginkortasuna fluoreszentzia eta analisi elementalaren bidez aztertu da.

5. Etorkizunerako planteatzen den norabidea

Polimeroen gainazalak eraldatzeak abantaila handiak ekar ditzake medikuntza munduan, hala nola, farmako ezberdinen biokonjugazioa PLLA bezalako polimeroaren gainazalean. Horretaz gain, konprobatu egin da azida eta alkinoaren arteko klik erreakzioa molekula konplexuak biokonjugatzen dituela modu sinple eta erraz batean. Hala ere, erreakzio honek zenbait desabantaila erakusten baititu, esaterako azida eta alkinoaren arteko erreakzio tradizionalean kobrea erabiltzen da katalizatzaile gisa. Kobreak zitototoxizitatea erakusten du, zitotoxizitate honek zelulen heriotza sortarazten du. Ondorioz, metal baten beharrak bere erabilera mugatzen du biomedikuntza arloan. Hori dela eta, kobrerik gabeko klik erreakzioaren erabilerak gero eta interes handiagoa izaten ari da arlo desberdineko zientzietan. Azken bi urte hauetatik aurrera, alkinoan oinarritutako hainbat aktibazio erreakzio proposatu dira (Kim, 2022).

6. Erreferentziak

Andrade-del Olmo, J., Pérez-Álvarez, L. (2018), Elikagaien paketatze aktiborako polimeroen gainazalaren aldaketa.. *Ekaia. Zientzia eta teknologia aldizkaria, 33, 129-148.* 10.1387/ekaia.17861

Arciola, C., Campoccia, D. (2018). Implant infection: adhesión, biofilm formation and immune evasión. *Nature Reviews Microbiology, 16, 397-409.* https://doi.org/10.1038/s41579-018-0019-y

Chandorkar, Y., Ravikumar, K., Basu, B. (2019). The foreign body response demystified. *American Chemical Society, Biomaterials Science Engineering, S, 19-44.* 10.1021/acsbiomaterials.8b00252

Kolb, H.C., Finn, M.G., Sharpless, K.B. (2001), Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a few good reactions. *Angewandte Chemie International Edition, 40, 2004-2021*

Rana, D., Ramasamy, K., Leen, M., Pasricha, R., Manivasagam, G., Ramalingan, M. *Biology and Engineering of Stem Cell Niches. Surface functionalization of Biomaterials*, A. Vishkarma, J. M. Karp (Ed), Academic Press, Cambridge, Massachusetts (2017).

Sánchez-Bodón, J., Moreno-Benítez, I., Pérez-Álvarez, L., Ruiz-Rubio, L., Vilas-Vilela, J.L. (2020), *Click* erreakzioa erabiliz aktibitate biologikoa erakusten duten Sistema polimerikoen garapena. *Ekaia. Zientzia eta teknologia aldizkaria, 37, 103-116.* https://doi.org/10.1387/ekaia.20847

Yoon, H.Y., Lee, D., Lim, D.K., Koo, H., Kim, K. (2022), Copper Free Click Chemistry: Applications in Drug Delivery, Cell Tracking, and Tissue Engineering. *Advance Materials,34.* https://doi.org/10.1002/adma.202107192

7. Eskerrak eta oharrak

Egileek erakundeek (SGIker eta GV/EJ) emandako laguntza (ELKARTEK programa, IDEAII, AVANSITE, μ4IoT) gizatiarra eskertzen dute.

Izorratu gabe ikertzea: PIT Tagen erabilera Euskal Herriko saguzar kabernikoletan

Lander Olasagasti, Miren Aldasoro, Nerea Vallejo, Urtzi Goiti, Joxerra Aihartza, Inazio Garin

Euskal Herriko Unibertsitatea
lander.olasagasti@ehu.eus

Laburpena

Saguzarrez hitz egiten dugunean, ugaztunen artean dibertsoenetarikoa den Chiroptera ordenaz ari gara. Dela ikerketan, dela kudeaketan banakoak identifikatzeko markak jarri behar izaten dira maiz. Hori horrela, saguzarrak markatzeko marka eta metodo ugari daude eskuragarri, bakoitzak bere abantailak eta desabantailak dituelarik. Horien artean, PIT Tagek animaliak pasiboki detektatzea ahalbidetzen dute, baina hauen erabilera espezie fisurikoletara egon da mugatua. Aurrerapen teknologikoei esker, lan honek PIT tagak baliatuz 3 saguzar espezie kabernikolaren populazio-ekologia eta ekologia espaziala ikertu ditu, lehenengoz Europan. Antenen detektagarritasuna hain izan da handia Jolly-Seber modeloek % 99 baino detektagarritasun balio altuagoak eman dituztela bai *Myotis myotis*-en eta bai *Rhinolophus euryale*-n. Bi espezie horien kasuan lehen urteko animalien biziraupena aldakorra izan da urtetik urtera. Gainera, emaitzek adierazten dute lehen urtea dela kritikoena hilkortasunari dagokionez espezie horientzat. *R. euryale* gazteak sexuarekiko independentea den filopatria eredua erakutsi dute; *M. myotis* gazteen artean, aldiz, soilik emeak izan dira filopatrikoak. Bukatzeko, *M. schreibersii* gazteek lehen urtean bertan distantzia luzeko mugimenduak egiten dituztela behatu da. Hori horrela, lan hau aurrekaria da metodologia hau saguzar kabernikoletan aplikatzean eta datozen urteetako erronkak finkatzen ditu.

Abstract

Bats constitute the second most diverse mammal order, Chiroptera. Research and management of free-ranging bats ordinarily require the identification of individuals. To do so, there are several marking methods. Among them, PIT tags allow passively detecting the animals, but due to the low detection range of the antennas, their usage has been limited to bats that roost in rock crevices. Here, we present the first work in Europe that implements PIT tag for the study of cave-dwelling bats. Our homemade antennas showed great detectability, in fact Jolly-Seber models showed detectability values higher than 99 % for *Rhinolophus euryale* and *Myotis myotis.* Yearling survival rate was lower than adult survival rate; besides, survivorship of yearling bats varied substantially between years. Regarding philopatry, in *R. euryale* males and females were highly philopatric, while only the females returned to their natal colony in *M. myotis*. Finally, we recorded several long distance movements of yearlings of *Miniopterus schreibersii*.

1. Sarrera eta motibazioa

Saguzarrez hitz egiten dugunean, ugaztunen artean dibertsoenetarikoa den Chiroptera ordenaz ari gara. Ezagutzen diren ia 1400 espezietatik 200 bat megakiropteroak (azeri hegalariak) dira, eta gainerakoak mikrokiropteroak (ohikoak zaizkigun saguzarrak), zeinak Antartika salbu kontinente guztietan zehar agertzen diren. Gainera, Chiroptera da Europan azken hamarkadetan gehien ikertu den ugaztun ordena. Euskal Herriko ikertalde ezberdinek ere literatura oparoa produzitu dute gurean aurki daitezkeen 27 saguzar espezieen inguruan (e.g. Alcalde eta Escala, 1999; Aldasoro et al., 2019; Vallejo et al., 2019). Izan ere, saguzarrek ikerketarako oso interesgarriak diren ezaugarri ugari dauzkate. Batetik, modu aktiboan hegatzea lortu duten ugaztun bakarra dira. Bestalde, erabateko iluntasunean zehaztasun osoz hegatzea, orientatzea eta elikagaiak atzematea ahalbidetzen dien zentzumena garatu dute: ekokokapena (Norberg eta Rayner, 1987) Gainera, animalia taldezaleak direnez, giza osasunerako kaltegarriak diren zenbait birusen bektoreak dira (Banerjee et al., 2019). Ekologia trofikoa ere sakon ikertu den arloa da; zeren eta espezie batzuk fruitujaleak, nektariboroak, hematofagoak edo haragijaleak badira ere, gehiengoa intsektujalea da, nekazaritzako izurri diren zenbait intsektuen kontrol biologikoa burutuz (Aizpurua et al., 2018). Tamalez, saguzar espezieen % 30ak kontserbazio arazoak ditu.

Dela ikerketan, dela kudeaketan, banakoak identifikatzeko markak jarri behar izaten dira maiz (Kunz eta Parsons, 2009); soilik hala eskura baitaiteke funtsezko ezagutza biziraupenari (O'Donnell, 2009), gordelekuarekiko fideltasunari (Lewis, 1995) edota migrazio aktibitateari (Hutterer et al., 2005) buruz. Hori horrela, saguzarrak markatzeko marka eta metodo ugari daude

eskuragarri, bakoitzak bere abantailak eta desabantailak dituelarik. Zaharrena, merkeena, oinarrizkoena, eta hargatik erabiliena, saguzarrei kode uniko bat duen eraztun edo banda bat jartzean datza. Baina, marka mota honek zauriak sor ditzake, saguzarren biziraupenari zein ugal-arrakastari erasanez (Baker et al., 2001). Gainera, sarritan kodea irakurgaitz geratzen da, bai animaliak eraztuna zarrastatu duelako, bai eta hezetasunaren eta bestelako kanpo-baldintzen poderioz. Azken hamarkadetan, animalien posizio zehatza ezagutarazten duten gailuak erabili dira, irrati-telemetrian naiz GPSan oinarritutakoak (Goiti et al., 2008). Animaliei jartzen zaizkien gailu horiek sistema elikatzeko bateriak daramatzate inkorporaturik, eta ondorioz pisutsuegiak dira saguzar espezie txikienentzat. Bestalde, bateriek biziraupen laburra izaten dute, asko jota bi astetakoa eta beraz ez dute epe luzeko ikerketak egiteko balio.

Azkenik, irrati frekuentzia bidezko identifikazioan (Radio Frequency Identification, RFID) oinarritzen diren Passive Integrated Transponder (PIT) tag delakoak ere erabili dira. PIT tag bat 10 mm-ko beirazko kapsula batez inguraturiko transponder edo txip bat da, zeina larruazalpean txertatzen baitzaio animaliari. Tag hauek ez dute inolako bateriarik behar, inaktibo dihardute harik eta eremu elektromagnetiko batek (antenak) kitzikatzen dituen arte; txip bakoitzarekiko esklusiboa den kodea emanez. Ezaugarri honetan datza markaketa metodo honen abantaila nagusia; izan ere, animalia ez da fisikoki harrapatu behar kodea irakurri ahal izateko (Smyth eta Nebel, 2013). Bestalde, txipak ez duenez bateriarik behar, tagak irakurgarri dirau animaliaren bizialdi osoan zehar. Hori horrela, metodologia hau darabilten lan ugari argitaratu dira (adib. Kerth eta Reckardt, 2003; Ellison et al., 2012; Ružinská et al., 2022) eta gaurdaino ez dago PIT tagek saguzarren biziraupenean edo ugal-arrakastan inpaktua eragiten dutenaren ebidentziarik.

Teknologia honen erabilera, ordea, gordeleku txikiak erabiltzen dituzten espezieetara mugatu da. Izan ere, saguzarren artean badira kobazuloetan edota eraikin abandonatuetan bizi diren espezieak (kabernikolak), baina baita zuhaitzetako zuloetan, paretetako zein harkaitzetako arrakaletan (fisurikolak) edo enbor azalen pean bizi diren espezieak ere. RFID antenen detekzio-tarte murritza dela eta (zentimetro gutxi batzuk), PIT tagekin egindako lanak azken talde horietako espezieetara mugatu dira. Baina, arrakala edo zulo batekin alderatuta, koba batek ezaugarri guztiz ezberdinak ditu. Batetik, kobek ingurune oso egonkorra eta segurua eskaintzen dute: koba barruko hezetasuna eta tenperatura kanpokoarekiko independentea baita, urte luzez irauten baitu, eta saguzarrak harrapariengandik hobeki babesten baititu. Bestetik, kopuruari dagokionez, kobak urriagoak dira eta elkarrengandik isolatuago egon ohi dira. Hori horrela, espezie kabernikolen gordelekuen erabilerak, populazio-ekologiak edo estruktura sozialak ez du zerikusirik saguzar fisurikolenarekin (Lewis, 1995).

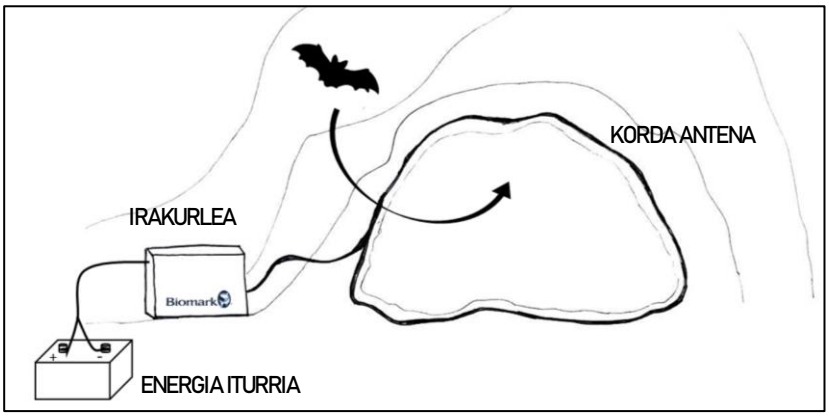
2. Arloko egoera eta ikerketaren helburuak

PIT tagen bidez espezie kabernikolak ikertzeko lehen ahaleginek ez zituzten emaitza positiboak erdietsi (Britzke et al., 2014; Adams eta Ammerman, 2015). Britzke et al. (2014) lanean leiho moduko itxiturak jarri zituzten koba sarreran, saguzarrak antenara bideratuz. Adams eta Ammerman (2015) lanean, aldiz, kobako sarrera zig-zagean gurutzatzen zuen antena bat baliatu zuten. Bi kasuetan antenen konfigurazioak saguzarren hegaketa larregi eraldatu zuen. Baina, azken aurrerapen teknologikoek antenen detekzio-tartea nabarmen handitu dute eta Ozeanian jada hasi dira RFID sistema handiekin (large RFID system) lehen lanak argitaratzen (van Harten et al., 2019, 2020, 2022; Bullen eta Reiffer 2020). PIT tagak detektatzeko RFID sistema hauek 3 atal nagusiz osatzen dira (1. Irudia): tagak irakurri eta erregistratzen dituen irakurlea, begizta moduan paratutako korda-antena luze eta elastikoa zeinak eremu elektromagnetiko bat sortzen baitu, eta sistema elikatuko duen energia-iturria. Hala, markatutako saguzar bat begiztan zehar pasatzen denean, irakurleak saguzar horri dagokion kodea erregistratzen du.

Lan honek aurrekaria izan nahi du Europan PIT tagak detektatzeko RFID sistema handien erabileran. Eta horretarako, Euskal Herrian topa daitezkeen 3 saguzar espezie kabernikola izan ditugu ikergai: *Rhinolophus euryale* ferra-saguzar mediterraneoa, *Miniopterus schreibersii* koba-saguzarra eta *Myotis myotis* arratoi-belarria. Espezie hauetako bakoitza familia ezberdin bateri dagokio, eta beraz historia ebolutibo ezberdina dute. Bestalde, espezie hauen bitartez, RFID sistema handiak hegakera-eredu ezberdineko espezieekin nola moldatzen diren testatu ahal izango dugu. Izan ere, *R. euryale* eta *M. myotis* ingurune itxietara (basoetara) moldaturiko hegalari motelak dira; bien hegoek itxura-ratio (*aspect ratio*) baxua dute, hau da, laburrak eta zabalak dira, eta beraz, abiadura baxuko baina maniobrabilitate altuko hegakera dute (Norberg eta Rayner,

1987). Aitzitik, *M. schreibersii*-ren hegoak luzeak eta estuak dira; ondorioz, espezie honek abiadura handiko hegaldiak burutzen ditu, ingurune irekietan ehizatako aproposagoak direnak eta distantzia luzeko mugimenduak egitea ahalbidetzen diotenak (Hutterer et al., 2005).

1. Irudia. RFID sistema handien irudi eskematikoa.



Hori horrela, lan honetan RFID sistema handien detektagarritasuna zenbatekoa den ebazten ahaleginduko gara. Eta detektagarritasunaren afera zehaztutakoan, aipatutako hiru espezieetako gazteen biziraupena eta filopatria aztertuko ditugu.

3. Ikerketaren muina

3.1 Antenaren detektagarritasuna

Harrapaketa-berrarrapaketan (*capture-recapture*) oinarritzen diren lanetan, beharrezkoa da berrarrapaketaren beraren efizientzia edo fidagarritasuna testatzea, are gehiago berrarrapatzeko erabiltzen diren antenak norberak eraikiak badira (Lettink eta Armstrong, 2003). Gau batean antena gurutzatzen duten indibiduo markatuetatik detektatzen direnen proportzio gisa definitu dugu detektagarritasuna. Berau kalkulatzeko marka bikoitza egitea (saguzar bakoitzari bi tag jartzea) planteatu genuen lehenik; baina, *tag colission* deritzonagatik, tag batek beste tag bat detektatzea galarazten du. Bigarren aukera gordeleku bakoitzeko bi antena jartzean eta antenen arteko emaitzak konparatzean zetzan. Hala ere, metodo hau baztertu egin genuen sistema baten funtzionamenduak bestean negatiboki eragin baitezake. Izan ere, zarata elektromagnetikoa da RFID sistemen funtzionamenduari gehien erasaten dion faktoreetariko bat (van Harten et al, 2019). Behin aukera horiek baztertuta, gordelekuarekiko fideltasun handiena izan dezakeen animaliekin lan egitea erabaki zen: urte berean jaiotako *Rhinolophus euryale* gazteekin.

Hori horrela, 2022ko udan Bizkaia mendebaldeko 2 kolonietako 74 eta 45 *R. euryale* gazteri taga jarri zitzaien eta markaketa osteko 10 egunetan antena bana izan genuen aktibo gordeleku bakoitzean. Animaliek markatu zireneko gordeleku bera egunero erabiltzea espero genuenez, markatutako animalietatik antenak detektatutakoen proportzioa erabili dugu detektagarritasunaren adierazgarritzat. Lehen kolonian (n = 74) detektagarritasuna %86.82 ± 1.97 izan zen eta bigarrenean (n = 45) 94.17 ± 0.41. Lehen koloniak, irteera printzipalaz gain, bigarren irteera txikiago bat du, zeina animaliek apenas erabiltzen duten; baina, kolonien arteko ezberdintasunak azal ditzaken. Gainera, markatutako animalia guztiak detektatu genituen lehen astean zehar eta ez genuen kolonien arteko mugimendurik erregistratu. Emaitza hauen bidez, lehen aldiz deskribatzen dugu modu fidagarri eta kontserbakorrean RFID antena handien detektagarritasuna. Lortutako balioak van Harten et al. (2019) lanean modu ez zunenean estimatu zirenak baino handiagoak dira. Gainera, kontuan izanik guk erabilitako parametroek mugimenduekin eta ez ateratzearekin (saguzar bat gau batean gordelekuan geratzea) negatibo faltsuak ematen dituztela, eskuraturiko balioak oso altuak dira eta beraz metodoaren baliagarritasuna indartzen dute.

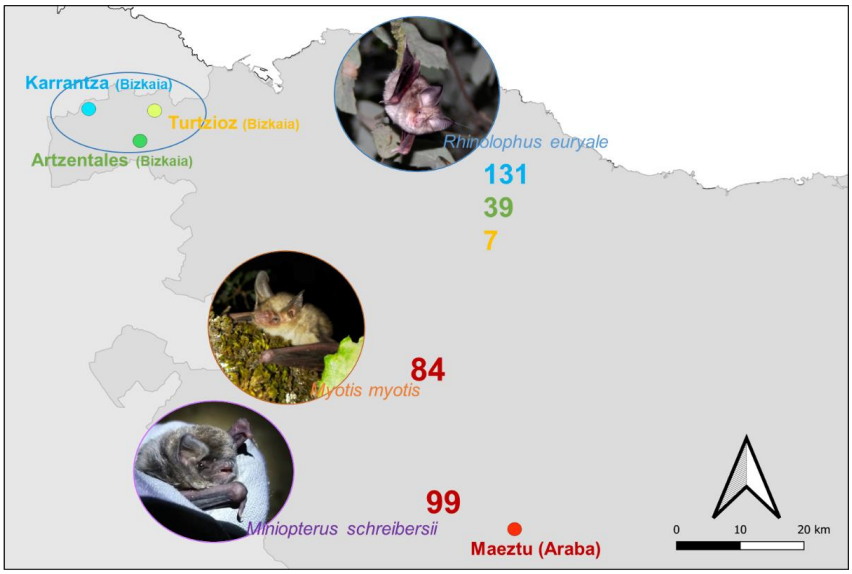
3.2 Gazteen biziraupena eta filopatria

2022an markatutako *Rhinolophus euryale* gazteen epe motzeko jarraipenaren bidez metodoaren fidagarritasuna balioztatu ostean, *R. euryale*, *M. myotis* eta *M. schreibersii* espezieetako gazteen biziraupena eta filopatria aztertuko ditugu. Filopatria da animalia batek jaiotako lekura

bueltatzeko duen tendentzia. Parametro hauek kalkulatzeko 2020ko eta 2021eko udatan markatutako animalien berrarrapaketa datuak erabiliko ditugu. Guztira 360 animalia markatu dira 4 koloniatan (2. Irudia). *M. myotis* eta *M. schreibersii* guztiak Maeztuko (Araba) koba batean markatu genituen: 53 *M. myotis* eta 53 *M. schreibersii* 2020an, eta 31 *M. myotis* eta 46 *M. schreibersii* 2021an. *R. euryaleak* elkarrengandik 10 km baino gutxiagotara Bizkaiko mendebaldean dauden 3 kolonia ezberdinetan markatu genituen. Karrantzako (Bizkaia) koba batean 70 eta 61 *R. euryale* markatu genituen hurrenez hurren 2020 eta 2021ean. Artzentaleseko (Bizkaia) baserri abandonatu batean 39 indibiduo markatu genituen 2020ko udan eta bat bera ere ez 2021ekoan. 2021eko udan 7 *R. euryale* markatu genituen Turtziozeko (Bizkaia) meazulo batean. Markatutako animalien sexu ratioa 1:1 izan da oro har. 2022ko udan ere markatu dira animaliak, baina oraindik ez dira hauek analizatzeko nahikoa datu eskuratu. Urtean zehar garai ezberdinetan izan ditugu antenak aktibo, saguzarren bizi-zikloko etapa ezberdinak kontuan hartuz.

Saguzarren harrapaketa eta manipulazioa animalien ikerketa eta irakaskuntzarako araudiak jarraituz egin zen. Harrapaketak Euskal Herriko Unibertsitateko Etika Batzordeak baimenduak izan ziren (M20/2021/137) eta eskualde bakoitzean zegokion gobernu-erakundeak emandako lizentziekin burutu ziren.

2. Irudia. Markatutako koloniak. Kolonia bakoitzean markaturiko animalia kopurua adierazten da.



Bizkaiko mendebaldeko *Rhinolophus euryale*-eri dagokienez, aipagarria da Jolly-Seber modeloen arabera detektagarritasuna % 99 baino handiagoa izan dela, hau da, bigarren urtean ez dela lehen urtean detektatu gabeko animaliarik detektatu. Beste era batera esanda, lehen negua pasa duten animalia guztiak detektatu ditugu, ez da negatibo faltsurik egon. Balio horiek oso altuak dira beste metodologiekin eskuratutakoekin alderatuta. Lehen neguko biziraupenari dagokionez, ezberdintasun handiak izan dira urtetik urtera, baina ez koloniatik koloniara. Lehen neguko biziraupena % 78koa izan da 2020an jaiotako ferra-saguzar mediterraneoetan eta % 50 ingurukoa 2021ean jaiotakoetan. Aldakortasun hori udazkeneko klimatologiarekin lotu izan da beste espezieetan; esaterako, Ameriketako Estatu Batuetan, uda amaiera euritsuak dituzten urteetan jaiotako *Myotis lucifugus*-ek bizirauteko probabilitate handiagoa dute udagoien lehorreko urteetan jaiotakoek baino (Frick et al., 2010). Bestalde, 2020an jaiotako ferra-saguzarren biziraupen-tasa % 78tik % 86ra igo zen bigarren neguan. Biziraupen eredu hau, zeinetan lehen urtea baita animaliarentzat kritikoena, ohikoa da saguzarretan eta baita hegaztietan, narrastietan eta beste ugaztunetan ere. Filopatria altua izan da bai arretan eta bai emeetan, animalia guztiak detektatu ditugu momenturen batean markatu genituen kolonian. Sexuarekiko independentea den filopatria eredu hau ez da batere ohikoa saguzarretan; Europan soilik *Plecotus auritus*-en deskribatu da lehenago. Izan ere, sexu baten edo bestearen filopatria ezak (dispertsioak) fluxu genetikoa ahalbidetzen du, odolkidetasun arazoak saihestuz. Arrak zein emeak filopatrikoak diren espezieetan ordea, beste mekanismo batzuk behar izaten dira odolkidetasuna saihesteko. Baina, *R. euryale*-ren ugalketari buruz gaurdaino ez dago bibliografia sendorik. Bukatzeko, kolonien arteko mugimendu ugari erregistratu dira. Mugimenduen

maiztasun altuak Bizkaiko mendebaldeko koloniek metapopulazio bat osatzen dutela iradokitzen du.

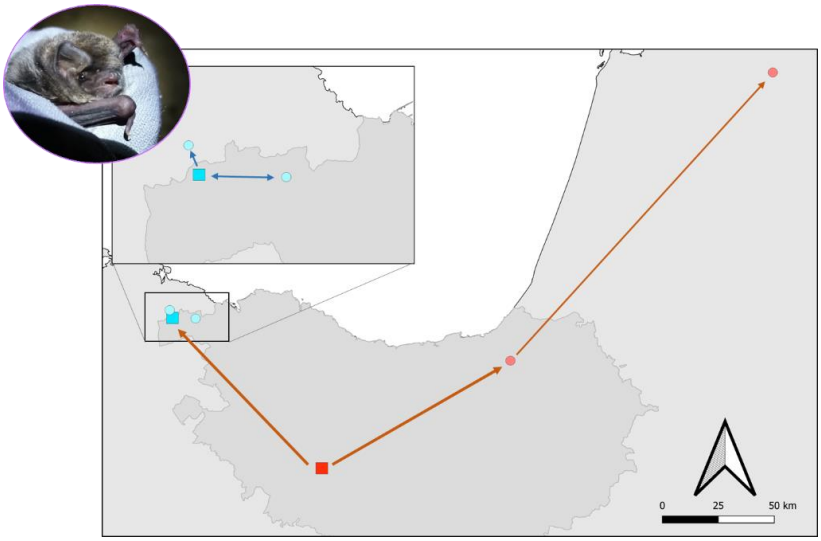
Myotis myotis-en kasuan, Jolly-Seber modeloek detektagarritasuna altua dela badiote ere, antenekin lagindutako egun kopurua Bizkai mendebaldean egindakoa baino baxuagoa da; eta beraz, bizirik dauden animalia batzuk detektatu ez izana gerta daiteke. Espezie honetan sexuen arteko ezberdintasunak nabarmenak izan dira. Lehen negua eta gero soilik emeak bueltatu ziren kumatze-koloniara eta ez zen ar bakar bat bera ere detektatu. Biziraupenari dagokionez, *R. euryale*-rentzat eskuratutako balio antzekoak lortu dira. 2020an markatutako emeen biziraupena % 73koa izan zen lehen neguan eta % 80koa bigarrenean. Aldiz, 2021ean markatutako eme gazteen % 50ak soilik gainditu zuen lehen negua. Filopatriari dagokiola, sexuak baldintzatutako dispertsio eredua behatu dugu, zeina ondo ikertuta dagoen bai espezie honetan baita *Myotis* generoko beste zenbait espezietan ere (Frick et al., 2010). Ar helduak bakartiak dira udan zehar, bakoitzak bere gordelekua (zuhaitz zulo bat edo arrakala bat) sutsuki defendatzen duelarik (Zahn eta Dippel, 2009). Gure emaitzek iradokitzen dute ar gazteek ere jokabide berdina dutela, lehen neguaren ostean ez baitira jaiotako koloniara bueltatzen. Emeei dagokienez, lehenago ere eskuratu da informazioa *M. myotis* emeek kumatze-koloniekiko duten filopatriaren inguruan eta filopatriak kumatzeko garaian dakartzan abantailen inguruan. Ez dago ordea informazio garbirik eme gazte ez ugalkorren filopatriaren inguruan. Lan honek modu argigarrian frogatzen du emeak lehen urtetik direla jaio ziren kumatze-koloniarekiko filopatrikoak. Baina, zein abantaila ebolutibo ditu filopatrikoa izateak kumatuko ez den saguzar batentzat? Erantzun konplexuko galdera da, faktore askoren konbinazioak baitu eragina (Ortega, 2016). Batetik, taldekatzeko arrazoi nagusietako bat termorregulazioa da. Bestetik, koloniakideekiko sozializazioak animaliari dakarzkion abantailak ere ugariak dira eta ezin bazter daiteke ikasketak izan dezakeen garrantzia. Edonola, gure emaitzek ez dute afera hau argitzeko daturik ematen.

Miniopterus schreibersii koba-saguzarraren kasuan, ez da gazteen biziraupenaren estima fidagarririk egiterik lortu. 2020an markatutako 53 indibiduoetatik 8 besterik ez ditugu detektatu eta 2021ean markatutako 46 indibiduoetatik soilik 6 detektatu ditugu. Gainera, Maeztuko koban antena jarri dugun aldiro indibiduo ezberdinak detektatu ditugu. 2021ean detektatu ez ziren 3 animalia 2022ko udan detektatu genituen adibidez. Espezie honekin izan dugun detektagarritasuna beraz ez da nahikoa izan. Detektagarritasun balio eskas horien atzean 4 faktore egon daitezke: markaren galera, animalien abiadurak antenen detekzio gaitasuna gainditu izana, hilkortasun handiegia egotea eta espeziearen ekologia. Tag galerari dagokionez, soilik Rigby et al. (2012) lanean aipatu da galera nabarmena (% 30 inguru). Hala ere, emaitzok txertaketa puntuan itsasgarri kirurgikorik aplikatu ez izanari egotzi zaizkio. Oro har, markatutako saguzarren % 3ak baino gutxiagok galtzen du taga (O'Shea et al., 2006; van Harten et al., 2021). Honi jarraiki, lehen markaketa-saiotik aplikatu izan dugu itsasgarri kirurgikoa, eta beraz inprobablea zaigu tag galeraren inpaktu gehiegizkoa. Gainera, 2021ean detektatu gabeko animaliak 2022an detektatu izanak beste esplikazio batzuk eskatzen ditu. Animaliek antena azkarregi gurutzatu izana baztertzeko, pasaldi bakoitzeko zenbat irakurketa erregistratzen diren aztertu dugu. Irakurgailuak 30 milisegundoro tag bat irakurtzeko gaitasuna du eta detektatutako *Miniopterus schreibersii*-en kasuan, antena gurutzatu duten aldiro irakurketa bat baino gehiago erregistratu dira. Gainera, ez dago ezberdintasunik *M. myotis*-ek eta *M. schreibersii*-k pasaldi bakoitzean produzitzen dituzten irakurketa kopuruan. Are gehiago, van Harten et a. (2019, 2020 eta 2022) lanetan *Miniopterus* generoko beste espezie bat ikertu da eta ez da antzeko arazorik behatu. Hilkortasun handiak lortutako emaitzak azal litzake, baina, berriro ere, 2021ean detektatu gabeko animaliak 2022an detektatu izanak detektagarritasun arazora bideratzen gaitu.

Esan bezala, Maeztuko detekzioak ez dira konstanteak. Adibidez, 2022ko ekaineko lehen astean detektaturiko 10 animalietatik soilik 5 detektatu ziren hilabete beranduago egindako detekzio-saioan. Uztaileko detekzio-saio hartan aipaturiko 5 animalia horiez gain beste 5 *Miniopterus schreibersii* berri detektatu genituen. Gainera, Maeztun markatutako zenbait koba-saguzar kilometro askotara dauden gordelekuetan detektatu ditugu kumatze-garaitik kanpo (3. Irudia). 2022ko abuztuan Maeztun markatutako koba-saguzar gazte bat Karrantzan detektatu zen hilabete beranduago. 2020an eta 2021ean Maeztun markatutako koba-saguzar bana Ainhoako (Lapurdi) koba batean detektatu dituzte Iparraldeko lankideek. Gainera, Ainhoan detektatutako animalia bat Ometen (Frantzia) detektatu dute ostera. Animalia hauetako bakoitza gau bakar batean detektatu da, ez dira luzez geratu bertan. Gainera, aipagarria da 2022an Karrantzan markatutako 9 *M. schreibersii* Ojebarreko (Espainia) koba batean detektatu ditugula. Markatutako

9 animalia hauek guztiak 4 egunen baitan agertu eta desagertu ziren. Ezaguna da espezie honek distantzia luzeko mugimenduak egiteko duen joera, zeintzuengatik espezie migratzailea kontsideratzen baita (Hutterer et al., 2005). Iberiar Penintsulan ere zenbait lanek jaso dituzte gordelekuen arteko mugimenduak (Serra Cobo et al., 1998; Garin et al., 2005). Mugimendu horiek mota ezberdineko gordelekuen artean gertatzen dira oro har, hau da, trantsizio-kolonien eta kumatze-kolonien artean, trantsizio-kolonien eta hibernazio-kolonien artean eta abar. Gure datuek, beraz, ez dute mugimenduen norabideari dagokion berritasunik eskaintzen. Bai ordea trantsizio gune horietan animaliek pasatzen duten denboraren inguruan; zeren eta zitatutako lanek eraztunketa erabiltzen dute markaketa metodo gisa, eta beraz, egun bakar batean gordelekuan aurkitutakoa islatzen dute. PIT tagen bidez, animalia bakoitzak gordelekua erabiltzeari noiz ekiten dion eta noiz uzten dion jakin dezakegu.

3. Irudia. Koba-saguzarraren mugimenduak.



Beraz, nola azaltzen ditu espezie honen ekologiak eskuratu ditugun emaitzak? Trantsizio gordelekuen erabilera kumatze-kolonietatik hibernazio-kolonietara egiten dituzten migrazioen parte litzake. Bitarte horretan animaliek trantsizio kolonia txiki, dinamiko eta efimeroak osatzen dituzte. Eskala handian burutzen den *fission-fusion* dinamika litzake. Bestalde, gazteek kumatze-garaian duten filopatria eta fideltasun eskasa azaltzeko, talde handietan elkartzeak *M. schreibersii* ez-ugaltzaileeri zer suposatzen dien aztertu behar dugu. Talde handiak osatzeak baditu abantailak, baina badira taldetik aldentzeko arrazoiak ere. Batetik, gazte ez ugalkor baten eskakizun metabolikoak eme ugalkorrekiko guztiz ezberdinak dira; adibidez, gazte bati, egunean zehar aktibo mantendu ordez, metabolismoa jaisteko tenperatura murriztea komeni dakioke. Bestetik, koloniaren tamaina zuzenki erlazionatuta dago parasito-kargarekin, eta beraz, kumerik ez duen animaliak abantaila atera dezake talde handienetik aldenduz. Beste faktoreetako bat bazkagatiko konpetentzia murriztea izan daiteke, kasu honetan animaliak konpetentzia gutxiago duten eremuetara joango lirateke. Hipotesi hauek zuzenak balira, datozen urteetan, indibiduoek heldutasun sexuala eskuratu ahala, orain artean detektatu ez ditugun animaliak detektatu beharko genituzke. Gainera, oraindik ugalkorrak ez diren indibiduo sub-helduak detektatzeko, ahalegin handiagoa egin beharko dugu, antenak kumatze-kolonian denbora luzez instalatuz eta trantsizio-koloniak maiz bisitatuz.

4. Ondorioak

Lan honek arrakastaz lortu du PIT tagak erabiltzea saguzar kabernikolen populazio-dinamika eta ekologia-espaziala aztertzeko, Europan aurrekaria bilakatuz. PIT tagek marka gisa, eta RFID sistema handiek kobetako detekzio sistema gisa aurrerapauso izugarria suposa dezakete saguzar kabernikolen ikerketan zein kontserbazioan. Izan ere, eraikitako antenak erraz instala daitezke ia koba guztietan, oso adaptagarriak baitira. Gainera, hain txikiak izanik, PIT tagak espezie guztietan injekta daitezke inpaktu negatiborik sortu gabe. Bukatzeko, azpimarragarria da eraikitako antenen detektagarritasuna % 85etik gorakoa izan dela kasu guztietan. Animaliak detektatzeko eraginkortasunari esker, biziraupenari eta hilkortasunari buuruz eskuratzen diren emaitzak oso fidagarriak dira. Hala, gure emaitzek, partzialak badira ere, gazteen biziraupena

urtetik urtera oso aldakorra izan daitekeela ikustarazteko balio izan dute. Konparatze aldera, bai *M. myotis*-en kasuan, baita *R. euryale*-ren kasuan ere, lehen urteko biziraupen-tasak beste metodo eta espezie batzuetan baino askoz ere altuagoak dira (Frick et al., 2010). Kontserbazio aldetik, lan honetan islatu da gordeleku berdinak erabiltzeagatik, espezie bakoitzak bere eskakizun eta erabilera propioak dituela. *Rhinolophus euryale*-ek eta *Myotis myots*-ek filopatria zein fideltasun handia erakutsi dute, eta beraz, kumatzen direneko gordeleku horien babesa bermatzea ezinbestekoa da espezieak kontserbatuko badira. *Miniopterus schreibersii*-ren kasua bestelakoa da, distantzia luzeko mugimenduak oso ohikoak izanik, espezie honen populazioa oso zabalduta baitago. Beraz, espezie hau kontserbatzera zuzendutako neurriek ekologiaren aspektu hau zorrotz zaindu beharko lukete, trantsizio koloniei behar duten babesa eskainiz.

5. Etorkizunerako planteatzen den norabidea

Aplikatzen ari garen metodologia oso eraginkorra dela frogatu ostean, datozen urteetako lana biziraupen eta hilkortasun tasari buruzko datuak pilatzean datza. Datuek diote hurrengo hamarkadetan, klima aldaketak bultzatuta, animalia askok haien ugaritasunean zein bizi-eremuetan aldaketa sakonak jasango dituztela. Horren aurrean, espezie ezberdinen hilkortasuna monitorizatzeak datu oso argigarriak ekar litzake. Baina, kontserbaziotik haratago, saguzar kabernikola ezberdinen populazio-ekologiaren eta ekologia-espazialaren ikerketan sakontzeko aukera eskaintzen digu teknologia honek. Hori horrela, uda honetan bertan *Rhinolophus euryale*-ren ugalkortasunaren inguruan ikertzeko saiakerak burutuko ditugu. Aipatu bezala, espezie honen ugalketari buruz dakiguna oso urria baita. Bestalde, hibernazio-kolonien erabilera, distantzia ezberdinetara dauden kolonien arteko mugimenduen maiztasuna eta abar ere ikertu ahal izango ditugu. Honi jarraiki, Euskal Herri Iparraldeko eta Frantziako lan-talde ezberdinekin elkarlanean, *Miniopterus schreibersii*-ren migrazioak PIT tagak erabiliz ikertzeko ahaleginak egingo dira.

6. Erreferentziak

Adams, E. R., and L.K. Ammerman. (2015). A serpentine antenna configuration for passive integrated transponder tag readers used at bat roosts. The Southwestern Naturalist, 60, 393–397. https ://doi. org/10.1894/0038-4909-60.4.393

Aizpurua, O., I. Budinski, P. Georgiakakis, S. Gopalakrishnan, C. Ibañez, V. Mata, H. Rebelo, D. Russo, F. Szodoray-Parádi, V. Zhelyazkova, V. Zrncic, M. T. P. Gilbert, and A. Alberdi. (2018). Agriculture shapes the trophic niche of a bat preying on multiple pest arthropods across Europe: Evidence from DNA metabarcoding. Molecular Ecology 27:815–825.

Alcalde, J. T., & Escala, M. C. (1999). Distribución de los quirópteros en Navarra, España. Boletin de la Real Sociedad Española de Historia Natural, 95, 157-171.

Aldasoro, M., Garin, I., Vallejo, N., Baroja, U., Arrizabalaga-Escudero, A., Goiti, U., & Aihartza, J. (2019). Gaining ecological insight on dietary allocation among horseshoe bats through molecular primer combination. PLoS One, 14(7), e0220081.

Baker G. Barry , Lumsden Lindy F. , Dettmann E. Belinda , Schedvin Natasha K. , Schulz Martin , Watkins Doug Jansen Loraine (2001) The effect of forearm bands on insectivorous bats (Microchiroptera) in Australia . Wildlife Research 28, 229-237.

Banerjee A, Kulcsar K, Misra V, Frieman M eta Mossman K. (2019) Bats and Coronaviruses. Viruses, 11(1):41.

Britzke, E. R., M.W. Gumbert, and M.G. Hohmann (2014). Behavioral response of bats to passive integrated transponder tag reader arrays placed at cave entrances. Journal of Fish and Wildlife Management, 5, 146–150. https ://doi.org/10.3996/082012-JFWM-065

Bullen, R.D. and S. Reiffer (2020). Measurment of roost entrance activity of Pilbaria leaf-nosed bats (Rhinonicteris aurantia) using passive integrated transponder tags. Australian Mammalogy. https://doi.org/10.1071/AM20054

Ellison, L. E., T.J. O'Shea, D.J. Neubaum, M.A. Neubaum, R.D. Pearce and R.A. Bowen (2007). A comparison of conventional capture versus PIT reader techniques for estimating survival and capture probabilities of big brown bats (Eptesicus fuscus). Acta Chiropterologica, 9, 149–160.

Frick WF, Reynolds DS, Kunz TH. Influence of climate and reproductive timing on demography of little brown myotis Myotis lucifugus. J Anim Ecol. 2010 Jan;79(1):128-36.

Garin, I.; Aihartza, J.; Agirre-Mendi, P.T.; Alcalde, J.T.; De Lucas, J.; De Paz, O.; Goiti, U.; Artazcoz, A. (2008). Seasonal movements of the Schreibers' bat, Miniopterus schreibersii, in the northern Iberian Peninsula. Ital. J. Zool., 75, 263–270.

Goiti, U., Garin, I., Almenar, D. Salsamendi, E. eta Aiartza J. (2008) Foraging by Mediterranean Horseshoe Bats (Rhinolophus euryale) in Relation to Prey Distribution and Edge Habitat. Journal of Mammalogy, 89: DOI:10.1644/07-MAMM-A-054R2.1

Hutterer, R., T. Ivanova, C. Meyer-Cords, L. Rodrígues. (2005). Bat migrations in Europe: a review of banding data and literature. German Agency for Nature Conservation, Bonn, Germany. 162 pp.

Kerth G and K. Reckardt (2003). Information transfer about roosts in female Bechstein's bats: an experimental field study. Proc Biol Sci. 7;270(1514):511-5.

Kunz, T.H., and S. Parsons, eds (2009) Ecological and behavioral methods for the study of bats. 2nd edition. The Johns Hopkins University Press, Baltimore.

Lettink, M., & Armstrong, D. P. (2003). An introduction to using mark-recapture analysis for monitoring threatened species. Department of Conservation Technical Series A, 28, 5-32.

Lewis, S.E. (1995) Roost Fidelity of Bats: A Review. Journal of Mammalogy, 76(2): 481–496.

Norberg, U. M. L., eta Rayner J. (1987) Ecological morphology and flight in bats (Mammalia; Chiroptera): wing adaptations, flight performance, foraging strategy and echolocation. Philosophical Transactions of the Royal Society of London. B, Biological Sciences 316:335–427.

O'Donnell, C.F.J. 2009. Population dynamics and survivorship in bats. Chapter 8. In: Kunz T.H., and S. Parsons, eds. 2009. Ecological and behavioral methods for the study of bats. 2nd edition. The Johns Hopkins University Press, Baltimore.

Ortega, J. (Ed.). (2016). Sociality in bats. Springer.

O'Shea, T.J., L.E. Ellison, and T.R. Stanley. 2004. Survival estimation in bats: historical overview, critical appraisal, and suggestions for new approaches. Pages 297–336 in W. L. Thompson, editor. Sampling rare or elusive species: concepts, designs, and techniques for estimating population parameters. Island Press, Washington, D.C., USA.

Rigby, E.L., J. Aegerter, M. Brash, and J.D. Altringham. 2012. Impact of PIT tagging on recapture rates, body condition and reproductive success of wild Daubenton's bats (Myotis daubentonii). Veterinary Record 170:101.

Ružinská, R., D. Lőbbová, and P. Kaňuch. 2022. Demographic characteristics shape patterns of dawn swarming during roost switching in tree-dwelling Daubenton's bat. Sci Rep 12, 10014.

Serra-cobo, j., v. Sanz, and j. P. Martínez-rica. 1998. Migratory movements of Miniopterus schreibersii in the north-east of Spain. Acta Theriologica, 43: 271–283.

Smyth, B. and S. Nebel. 2013 Passive Integrated Transponder (PIT) Tags in the Study of Animal Movement. Nature Education Knowledge 4(3):3

Vallejo, N., J. Aihartza, U. Goiti, A. Arrizabalaga, C. Flaquer, X. Puig, M. Aldasoro, U. Baroja eta I. Garin. 2019. The diet of the notch-eared bat (Myotis earginatus) across the Iberian Peninsula analysed by amplicon metabarcoding. Hystrix, the Italian Journal of Mammalogy, 30(1): 59-64.

van Harten, E., T. Reardon, L. F. Lumsden, N. Meyers, T. A. A. Prowse, J. Weyland, and R. Lawrence. 2019. High detectability with low impact: optimizing large PIT tracking systems for cave-dwelling bats. Ecology and Evolution 9:10916–10928.

van Harten, E., T. Reardon, P. H. Holz, R. Lawrence, T. A. A. Prowse, and L. F. Lumsden. 2020. Recovery of southern bent-winged bats (Miniopterus orianae bassanii) after PIT-tagging and the use of surgical adhesive. Australian Mammalogy 42:216–219.

van Harten, E., P.E. Lentini, R. Bender, L.F. Lumsden, C. Visintin, S.R. Griffiths. 2021. Low Rates of PIT-Tag Loss in an Insectivorous Bat Species. The Journal of Wildlife Management 85(8): 1739–1743.

Zahn A. eta Dippel A. (2009) Male roosting habits and mating behaviour of Myotis myotis. Journal of Zoology, 243 (4), 659-674.

7. Esker onak

Eskerrak eman nahi dizkiet saguzarren markaketetan, baterien aldaketetan eta beste mila lan txikietan lagundu didaten kide guztiei. Era berean, Eusko Jaurlaritza eskertu nahi dut lan hau parte den doktorego tesia aurrera atera ahal izateko diru laguntza emateagatik. Proiektua finantzatzeko erabili dira euskal unibertsitate sistemako ikerketa-taldeen jarduerak bultzatzeko diru-laguntzak: it1571-22.