



Gradu Amaierako Lana / Trabajo Fin de Grado
Biologiako Gradua / Grado en Biología

Hediste diversicolor ITSAS POLIKETOAREN AZTERKETA BIOKIMIKO ETA HISTOLOGIKOA

Egilea/Autor:
Yune Mallona Martín
Zuzendaria/Director/a:
Maren Ortiz Zarragoitia
Beñat Zaldibar Aramburu

© 2015, se puede proteger poniendo "nombre y
apellidos/izen abizenak" ezarri babez zaitzke edo
Lizentzia CC batekin babestu/o con una Licencia CC:

<http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

AURKIBIDEA

1.	LABURPENA/ABSTRACT	3
2.	SARRERA	4
3.	HELBURUAK	8
4.	MATERIAL ETA METODOAK	8
4.1	Dieta desberdinen eragina <i>H. diversicolor</i> -en tamainan eta pisuan.....	8
4.1.1	Sedimentuaren bilketa eta lantzea	8
4.1.2	Esperimentuaren garapena	9
4.2	<i>H. diversicolor</i> -en bi populazioen konparaketa biokimikoa eta histologikoa	9
4.2.1	Animalien bilketa eta lantzea.....	9
4.2.2	Ezaugarri histologikoen azterketa.....	9
4.2.2.1	Hematoxilina-Eosina tindaketa.....	10
4.2.3	Zelulen energia kopurua (CEA; cellular energy allocation).....	11
4.2.3.1	Lipidoen kuantifikazioa.....	11
4.2.3.2	Karbohidratoen kuantifikazioa.....	11
4.2.3.3	Proteinen kuantifikazioa.....	12
4.3	Analisi estatistikoak.....	12
5.	EMAITZAK	13
5.1	Dieta desberdinen eragina <i>H. diversicolor</i> -en tamainan eta pisuan.....	13
5.2	<i>H. diversicolor</i> bi populazioen konparaketa biokimikoa eta histologikoa.....	14
5.2.1	Azterketa histologikoak	14
5.2.2	Azterketa biokimikoak.....	17
6.	EZTABAIDA	20
7.	ONDORIOAK	22
8.	BIBLIOGRAFIA	22

1. LABURPENA

Estuarioak, ekosistema itsastarren artean, ekoizpen biologiko altuko zonaldeak dira, non ur geza eta ur gazia nahasten diren. Giza eta industriaren aktibitatearen eraginez, ekosistema hauek asaldura nabariak jasaten dituzte eta estuarioetako sedimentuak barneraturiko substantzia kimikoen biltegi dira. Hori dela eta, sedimentuan bizi diren animaliek estres horiek jasaten dituzte, esate baterako, hainbat animalientzat elikagai baliabide garrantzitsua eta estuarioetan espezie gakoa den *Hediste diversicolor* poliketoak. Etorkizunean poliketo hau esperimentalki erabiltzeko zenbait baldintza aztertu ziren. Lehenengo, dietaren eragina ikertu zen. Plentziako estuarioko sedimentuan (Euskal Autonomia Erkidegoa) haztegiko zizareak arraintzako bi dieta komertzial (*Vipagran* eta Lupina pentsua) desberdinekin mantendu ziren hilabetez. Beraien hasierako eta amaierako tamaina eta pisua aztertu ziren. Ondoren, haztegiko poliketoak, zelaiko zizareen populazio batekin konparatu ziren histologikoki eta biokimikoki, erreserba materialen banaketa aztertuz. Lipidoak, karbohidratoak eta proteinak aztertu ziren eta zelulen energia kopurua (CEA) parametroa kalkulatu zen. Lorturiko emaitzen arabera, ez zen ikusi bi dieten arteko diferentzia zizareen hazkuntzan, agian geratutako biziraupen mugatuagatik. Bestetik, haztegiko eta populazio basatiko poliketoen artean desberdintasun esangarriak ikusi ziren energia materialen edukian. Haztegiko poliketoak lipido eta karbohidratoetan oso aberatsak ziren indibiduo basatiekin konparatzean. Era berean CEA altuagoa erakutsi zuten haztegiko poliketoek. Ondorioz, etorkizunean poliketo hauekin esperimentuak burutzerakoan, kontutan hartu beharko da erabilitako indibiduen jatorria (haztegikoa edo basatia) eta esperimentazio baldintzak.

ABSTRACT

Estuaries, are marine ecosystems of high biological production areas where fresh water and salt water are mixed. As a consequence of human and industrial activity, these ecosystems have been subjected to considerable agitation and storage of chemicals are included in estuarine sediments. Therefore, animals that live in the sediments suffer from stress; for instance, *Hediste diversicolor*, which is a key species in estuaries amongst polychaetes, because it is an important food resource for a variety of animals. Certain conditions of these polychaetes were studied experimentally for the future. First, it was investigated the effect of diet. Hatchery worms in sediment from Plentzia's estuary (Basque Country), were fed by two fish commercial diets (*Vipagran* and bass feed). Their initial and final size and weight were studied. Then, hatchery populations were compared with wild samples histologically and biochemically, analyzing the distribution of reserves of materials. Lipids, carbohydrates and proteins were analyzed and the number of cellular energy (CEA) parameter was calculated. According to the results, there was no difference between both diets related to the growth of worms, maybe because of the limited survival of individuals. On the other hand, farmed and wild

populations of polychaetes had significant differences on the energy content of the material. Comparing farmed and wild polychaetes, farmed individual's lipids and carbohydrates were very rich. CEA also showed higher values in hatchery polychaetes. As a result, when carrying out experiments with polychaetes in the future, the origin of individuals (hatchery or wild) as well as the experimental conditions should be taken into account.

2. SARRERA

Kostaldeko ekosistema garrantzitsuenetakoen artean estuarioak aurki daitezke, non ozeanoko ur gaziaren eta ibaietako ur gezaren arteko nahasketa ematen den (Day *et al.*, 1989). Estuarioak ekoizpen biologiko altuko eskualdeak dira; arrain, ornogabe, hegazti e.a. askoren bizi zikloan erabakigarriak direlarik. Hori dela eta, oso garrantzitsua da estuarioen bioaniztasunaren jasagarritasuna mantentzea kostaldeko zonaldeen osasun ekologiko eta ekonomikoa mantentzeko. Bestalde, zonalde hauek jarduera industrial handien eta hiriguneen asaldurak jasaten dituzte (Belzunce *et al.*, 2004); hau da, ibaiek garraiatutako isurtze antropogenikoen azken hartzaileak dira (Drouot *et al.*, 2007). Ondorioz, gehiegizko elikagaien kontzentrazioa, habitat aldaketa eta produktu kimiko toxikoen sarrera bezalako prozesuek kalteak sortaraz ditzakete (Kennish, 2002).

Beste alde batetik, estuariora sartzen diren kutsatzaile gehienak sedimentuko partikulekin lotzen dira eta estuarioen mugetan jalkitzen dira. Hala ere, sedimentuek ekosistema urtarretan ez dute soilik kutsatzaileen biltegi gisa jokatzeko, baita kutsatzaileen iturri gisa ere (Cardoso *et al.*, 2008). Patogenoak, mantenugaiak, metalak, e.a. material organiko edo inorganikoetan zurgatuak izan daitezke. Kutsatzaile hauen karga handia izan ezker, sedimentuek kutsatzaile kopuru altuak meta ditzakete eta honen ondorioz, zuzenean edo zeharka ekosistemak aldarazi daitezke, biotaren galera ekarri (Burton, 2002).

Sedimentuarekin estuki lotutako espezie bentonikoek, estres kimikoen aurreko esposizioa jasaten dute. Estres honekiko tolerantzia mekanismo ezberdinen bidez eman daiteke; adibidez, antioxidatzaileen ekoizpena, zurgapenaren mugatzea, xenobiotikoen biotransformazioa eta metalen detoxifikazioa. Orokorrean, estresari aurre egiteak, defentsa gisa edota sorturiko kalteak konpontzeko, energia kostu altua eskatzen du. Beraz, elikaduraren bidez lortutako energia guztia, ez da mantentzeko, hazkuntzarako edota ugalketarako eskuragarri egongo. Honek, indibiduen osasun egoeran eta ondorioz, populazioen patuan, eragin latzak izango ditu. Zelulen energi kopurua (CEA; cellular energy allocation) deritzon parametroak adierazten du organismo baten erreserba materialen eduki energetikoa. Zehazki, lipido, karbohidrato eta proteinen energia kopurua kontutan hartzen ditu

(Durou *et al.*, 2008). Kutsatutako sedimentuen eraginpean edukitako *Arenicola marina* itsas zizarean, energia erreserbarako parametroen (proteina, karbohidrato eta lipidoak) mailetan aldi baterako emendioak frogatu ziren, baina epe luzera (4 aste), esposizio honek lipido eta eskuragarri zegoen energia kopuru totalaren beherakada ere eragin zuen (Macrae, 2009). Kutsatzaileek eragindako estresak, mantenurako beharrezkoa den energia beharra emendatuko du eta ondorioz, hazkuntza eta ugalketarako eskuragarri dagoen energia gutxituko da (De Coen eta Janssen, 1997).

Aipatu erreserba materialen mailak biomarkatzaile moduan erabili daitezkeela. Ur inguruaren kalitatea ebaluatzeaz gain, biomarkatzaileak sedimentuetan kutsatzaileen bioeskuragarritasuna ebaluatzeko eta organismoen maila biologiko desberdinetan gertatzen diren aldaketak neurtzeko ere erabiltzen dira (Benedetti *et al.*, 2012). Gaur egun, azterketa bateratuak egiten dira, datu kimiko eta biologikoekin, ekosistemen osasun maila interpretatzeko eta ondorio egokiagoak lortzeko. Horrela, biomarkatzaile desberdinen bidez, organismoak kutsatzaileekiko esposizioa jaso duen eta esposizio hori zein magnitudetako den jakin daiteke (Cajaraville *et al.*, 2000).

Hainbat faktore edota parametro kontutan hartzea ezinbestekoa da biomarkatzaileen aldakortasuna eta sentikortasuna aztertzerakoan; hala nola, sexua, adina, egoera fisiologikoa eta ingurunearen ezaugarri fisikoak. Biomarkatzaileen erabilpena organismo urtarretan ohikoa bihurtzen ari da eta hau horrela hainbat ornodun zein ornogabe espezieetan aztertu da, baita *Hediste diversicolor* poliketean ere (Solé *et al.*, 2009).

Hediste diversicolor poliketo espeziea, antzina *Nereis diversicolor* gisa sailkatua, sedimentuan bizi da; beraz, sedimentuen egoeraren azterketarako organismo egokia da. Hori dela eta, estuarioen sedimentuen osasuna ebaluatzeko hainbat azterketetan erabilia izan da (Solé *et al.*, 2009). Gainera, espezie honek paper garrantzitsua betetzen du estuarioetako kate trofikoan (Ait Alla *et al.*, 2006); izan ere, arrain eta hegaztien elikagai iturri nagusia da. Beraz, estuarioetako espezie gakoa dela kontsideratu daiteke (Durou *et al.*, 2007).

***Hediste diversicolor* poliketoaren sailkapena eta ezaugarri nagusiak**

Annelida filuma, Polychaeta klasea, Phyllocoida ordena, Nereididae familia eta *Hediste* generoaren barruan kokatzen da. *Hediste diversicolor* izena onartzen da gaur egun, nahiz eta lehenago *Nereis diversicolor* moduan izendatua izan den (World Register of Marine Species, 2015) (1 Irudia).



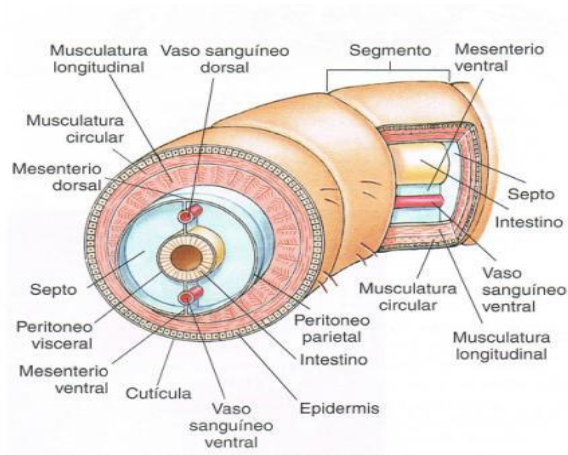
1 Irudia. *Hediste diversicolor* poliketoaren argazkia.

(Iturria: <http://ramdigestivesystem.weebly.com/ragworms-neriididae.html>)

Anelida filumak zizare segmentatuak hartzen ditu bere barnean; izainak, lur zizareak eta itsas zizareak, hain zuzen ere. Filum honetako espezieen ezaugarri nagusia gorputza metameroetan antolatua izatea da. Gorputzaren antolakuntzari dagokionez, zenbait alde bereiz daitezke. Burualdean, segmentu batzuk fusionaturik ager daitezke, burua edo *acron*-a osatuz, hau prostomio izenez ere ezaguna delarik. Atzealdean ere, segmentu batzuk fusionaturik ager daitezke, pigidio izena hartzen dutelarik eta uzkia bertan kokatzen da. Animalia metamerikoetan, segmentuen hazkuntza pigidioaren aurreko partetik gertatzen da. Gainera, digestio-hodia oso luzea izaten da orokorrean, hau gorputz osoan zehar luzatzen delarik (Barnes, 1985). Bestetik, Phyllodocida ordena eta Nereididae familiaren ezaugarri nagusiak hurrengoak dira: animalia nahiko handiak izatea, segmentazio homonomoa aurkeztea, parapodio ondo garatuak izatea, faringean baraila pare handiak eta kurbatuak izatea eta gehienak harrapariak izatea (Brusca eta Brusca, 2005). Espezie honetan kolorea oso aldakorra da, (bizirik daudenean) hori, laranja, berde edo marroi gorrixkak izan daitezke, banda ilun longitudinalak aurkezten dituztelarik. Habitatari dagokionez, estuarioetako sedimentuetan bizi dira, U formako gordeleketan (bi irekidura edo gehiagorekin) (Banta eta Andersen, 2003).

Anatomia

Poliketoen kanpo tegumentua, epitelio zilindrikoa da eta kanpo aldean kutikula deritzon eta babes funtzioa duen geruza mehea dago (Barnes, 1985). Epidermisa epitelio geruza bakar batek osatzen du, zelulak kolumnarrak izanik. Epidermisaren azpitik, ehun konektibo geruza dago eta honen azpitik, aldiz, bi geruza bereiz daitezke: geruza muskular zirkularra eta barnerago geruza muskular longitudinala. Muskulu geruza peritoneoak estaltzen du, honek barrunbe zelomikoa eta barne organoak inguratzen ditu (Brusca eta Brusca, 2005) (2 Irudia).



2 Irudia. Poliketo baten anatomiaren eskema orokorra, ikuspegi transbertsal batean.

(Iturria: http://aprendiendocondanielal1.blogspot.com.es/2014_06_01_archive.html)

Digestio traktuari dagokionez, ahoan hasi eta uzkiez bukatzen da (Iza *et al.*, 1982). Aurre digestio traktua hiru zatitan banatua dago: aho aldea, faringea eta esofagoa (Fox, 2007). Esofagoaren atzealdean digestio traktu ertaina dago, hau animali osoa zeharkatzen duen hodi zuzen eta luzea izanik. Elikagaien higadura digestio aparatuan zehar, zelula muskularren uzkurketa mugimenduz eta heste zelulen zilioen bitartez egiten da. Espezie harrapari bat izanik, batez ere proteasak sortzen ditu hestean eta zelulen kanpoko digestioa ematen da argian. Azkenengo segmentuan animalia osoa uzkiez dago (Iza *et al.*, 1982 ; Brusca eta Brusca, 2005; Fox, 2007).

Ugalketari dagokionez, *Hediste diversicolor* dioikoa da eta ugalketa sexuala burutzen du. Hainbat poliketo espeziek bezala, gonokoristikoa da, baina gonadak ez dira egitura mugatuak, peritoneoan garatzen diren gameto multzoak baizik (Benito *et al.*, 1982). Gametoen osaketa gorputz osoan zehar eman daiteke, zizare helduen zeloma espermatozoide edo obuluz beterik egoten delarik (Brusca eta Brusca, 2005).

Hediste diversicolor zizarea espezie gakoa da estuarioetan hainbat arrazoiengatik; besteak beste, espezie honek sorturiko bioturbazioak mantengaien eta kutsatzaileen ziklo biogeokimikoan eragin handia du, ekosistema hauetan duen ugaritasun, garrantzia ekologiko eta sedimentuan edota ur zutabeen kutsatzaileekin kontaktuan egoteagatik (Banta eta Andersen, 2003; Blaise *et al.*, 2013). Azkenaldian, kutsatzaile antropogeniko berriak (esate baterako, mikroplastiko eta nanopartikulak) ekotoxikologia ikerketen itua bihurtu dira eta poliketoek jada erakutsi dute azaleratzen ari diren konposatu hauen aurreko azterketetan bioadierazle oso erabilgarriak direla (Galloway *et al.*, 2010; Lewis eta Watson, 2012). Hau horrela, beharrezkoa da poliketo hauen erabilpena laborategi saiakeretan lantzea edo aztertuko dituzten lanetarako protokoloak garatzea. Beraien mantenua laborategi baldintzetan modu egokian egiteak ahalbidetuko du organismo hauen erabilpena hedatzea.

Hediste diversicolor espeziea ekosistema naturaletan aurkitzeaz gain, akuikultura haztegietan ere kultibatzen da, mihi-arrain eta izkiren jaki gisa (Fidalgo e Costa *et al.*, 2000). Gainera, Nereididae familiako espezieak arrantzako beita komertzial gisa ere erabiltzeak bultzatzen du *H. diversicolor* haztegietan kultibatzea (Fidalgo e Costa, 1999). Beraz, haztegietan egoera kontrolatuetan hazitako organismoek oso aukera egokia eskaintzen dute, ekotoxikologia azterketetan populazio homogeen eta kontrolatuak erabiltzeko aukera baitira. Hala ere, zelaiko populazioekin erakutsi ditzaketen desberdintasunak ezarri beharko lirateke etorkizunean emaitza konparagarriak eta hedagarriak lortu ahal izateko.

3. HELBURUAK

Lan honetan *Hediste diversicolor* itsas poliketoaren mantenua laborategian eta populazio desberdinen histologia eta erreserba materialen edukia aztertu nahi zen, etorkizunean espezie hau toxikologiazko azterketetan erabili ahal izateko. Horrela, ondorengo helburu zehatzak ezarri ziren:

- *Hediste diversicolor* poliketoaren hazkuntza aztertzea laborategiko baldintzetan arrainen dieta komertzialak erabiliz.
- *Hediste diversicolor* poliketoaren jatorri desberdineko (haztegia eta basatia) bi populazioen azterketa histologikoa eta erreserba materialen karakterizazio biokimikoa egitea.

4. MATERIAL ETA METODOAK

4.1 Dieta desberdinen eragina *H. diversicolor*-en tamainan eta pisuan

4.1.1 Sedimentuaren bilketa eta lantzea

Sedimentua Euskal Autonomia Erkidegoko Butroe ibaiaren estuarioan hartu zen, Plentzian (43°24'25.9"N 2°57'02.7"W) , 2013ko abuztuan. Itsas beheran hartu zen eta plastikozko tanke handi batean gorde zen laborategira eraman arte (Arias Isaza, 2003).

Laborategian, hartutako sedimentu guztia pixkanaka aztertu eta bahetu zen, partikula handiak (adibidez, harriak edo hostoak) edo bertan zeuden organismoak kentzeko asmoz. Ondoren, 5 litroko

hiru ontzi hartu eta hauetan sedimentua 5 cm-ko altuerara arte bete zen, hiruretan sedimentu geruza kopuru berdina jarri zelarik (Fidalgo e Costa *et al.*, 2000).

4.1.2 Esperimentuaren garapena

Haztegiko *H. diversicolor* (NAPA haztegikoak; Frantzia) indibiduoak sartu ziren ontzietan, 25 indibiduo ontzi bakoitzean. Aldez aurretik, indibiduen tamaina eta pisua indibidualki neurtu zen. Ontziek etengabeko iragazitako itsas uraren berriztapena zeukaten.

Hiru ontzi zeuden, bat kontrolerako erabili zelarik, hau da, zizareak baraualdian mantendu ziren. Beste bietan *Vipagran* (SERA, Alemania) eta lupina pentsua (Skretting, Espainia) jakiak gehitu ziren, hauek arrain jana direlarik, 200-220 mg jaki tankeko. *Vipagran* jaki komertzialaren konposaketa landare jatorrizko eta arrain olio eta bibalboen proteinetan (%40,4), gantzetan (%8,7) eta zuntz ezberdinetan (%3,4) oinarrituta dago. Lupina pentsuari dagokionez, arrain irin, soia, arrain olio, arto gluten eta gariz osatuta dago eta hauek proteinetan (%54), gantzetan (%15) eta zuntz ezberdinetan (%1,7) oinarrituta daude.

Zizareei janaria ematerakoan, ontzien ur berriztapena gelditzen zen ordu betez gutxi gora behera, elikagaia sedimentatzeko asmoz. Bestela, ur korrontearen bidez, jakiaren proportzio altu bat galtzen zen.

Zizareak astean bitan elikatzen ziren (astelehen eta ostegunetan). Gainerako egunetan, ur berriztapena ondo zegoela frogatzen zen eta tankeak aztertzen ziren (Fidalgo e Costa *et al.*, 2000). Esperimentuaren iraupena hilabete batekoa izan zen, 2013ko abuztutik 2013ko irailera arte.

4.2 *H. diversicolor*-en bi populazioen konparaketa biokimikoa eta histologikoa

4.2.1 Animalien bilketa eta lantzea

Hediste diversicolor poliketoaren lagin heldu natiboak, Euskal Autonomi Erkidegoko Butroe ibaiko estuarioan - (Plentzia) (43°24'25.9"N 2°57'02.7"W) - hartu ziren 2014ko abuztuan. Laginak itsas beheran hartu ziren eta plastikozko poteetan gorde ziren laborategira heldu bitartean (Arias Isaza, 2003). Bestetik, haztegiko *H. diversicolor* zizareak NAPA etxe komertzialeko dendan erosi ziren eta zuzenean eraman ziren laborategira. Poliketo guztien disezioak, laginak laborategira heldu eta berehala burutu ziren.

4.2.2 Ezaugarri histologikoen azterketa

Azterketa histologikoa burutzeko, poliketoen disezioa burutu zen, non zizareen hiruzonalderen zatiak hartu ziren: S1 (buruaren atzeko zonaldeari dagokiona), S2 (zizarearen erdiko

zonaldeari dagokiona) eta S3 (zizarearen atzealdeko zonaldeari dagokiona). Zonalde bakoitzetik gutxi gora behera 5 mm-tako zatiak ebaki ziren eta hauek histologiako kaseteetan sartu ziren.

Laginak formalina (%10 formaldehidoa) zuen itsas uretan fixatu ziren. Ondoren, %70-eko alkoholean mantendu ziren. Laginak fixatu ondoren, deshidratatu eta parafinan inkluditu ziren errutinazko protokoloa jarraituz. Laginak inkluditzerako orduan, laginaren orientazioa kontutan hartu zen, histologikoki esangarriak ziren ebakiak lortzeko asmoz. Beraz, laginak bertikalki kokatu ziren, zeharkako mozketak ahalbidetzeko asmoz.

Ondoren, parafina blokeak mikrotomoan moztu ziren 5 µm-tako lodierako ebakiak lortuz eta hauek kristalezko euskarrietara albumina erabiliz itsatsiz. Ebakiak hematoxilina-eosina protokoloaren bidez tindatu ziren.

4.2.2.1 Hematoxilina-Eosina tindaketa

Hematoxilina-Eosina tindaketa *Autostainer* makina automatikoaren (*LEICA AUTOSTAINER XL*, Leica Biosystems Nussloch GmbH, Alemania) bidez burutu zen eta hurrengo protokoloa jarraitu zen (1 Taula). Ondoren, laginak DPX (*Distyrene Plasticizer Xylene*)-ean montatu ziren.

1 Taula. Hematoxilina-Eosina tindaketaren protokoloa *H. diversicolor* poliketaren ebakinentzat.

Produktuak	Denbora
Xilola	10 min
Xilola	10 min
Alkohol absolutua	2 min
Alkohol absolutua	2 min
Alkohola 96°	2 min
Alkohola 70°	2 min
Ur destilatua	5 min
Hematoxilina	4 min
Alkohol azidoa	10 seg
Litio karbonatoa	10 seg
Txorrotako ura	1 min
Eosina	1:30 min
Txorrotako ura	1 seg
Txorrotako ura	1:30 min
Alkohola 70°	5 seg
Alkohola 96°	10 seg
Alkohol absolutua	15 seg
Alkohol absolutua	20 seg
Xilola	1 min
Xilola	1 min

Laginak *OlympusB61* (Olympus Corporation, Tokio, Japonia) mikroskopioan aztertu ziren, handipen ezberdinak erabiliz (x4, x10, x20 eta x40). Bestetik, argazkiak egiteko eta editatzeko *NIS elements F32* (Nikon Corporation, Tokio, Japonia) programa erabili zen.

4.2.3 Zelulen energi kopurua (CEA; cellular energy allocation)

Azterketa biokimikoak burutzeko asmoz, *Hediste diversicolor* zizareen diseekzioa egiterakoan, azterketa histologikoetarako aukeratu ez ziren gorputzaren atalak (burua kontutan hartu gabe) kriobioletan sartu eta hauek nitrogeno likidotan murgildu ziren eta ondoren -80°C-ko hozkailuan gorde ziren.

Azterketa biokimikoak egiterakoan, hurrengo parametroak neurtu ziren: lipidoak, karbohidratoak eta proteinak.

Biokimikarako, nitrogeno likidotan izoztutako laginak -80°C-ko hozkailutik atera eta zati bakoitza pisatu zen, emaitzak pisuaren arabera aztertzeko asmoz. Ondoren, 2 mL-ko bioletan sartu ziren, eta lagina homogeneizatzeko ur destilatua gehitu zen 1:2 pisu: bolumen erlazioan. Homogeneizazioa burutzeko, zirkoniozko bolatxoak erabili ziren (*Precellys 24 lysis and homogenization*; Bertin technologies, Frantzia) (6000 bira minutuko eta 1 minutuz).

4.2.3.1 Lipidoen kuantifikazioa

Homogeneizatu ostean, beste 2 mL-ko bial berrietan 200 µL lagin jarri ziren. Bertatik, 20 µL lagin hartu, 200 µL H₂SO₄ (%97) gehitu eta nahastu ziren. Ondoren, laginak 10 minutuz berotu ziren irakiten zegoen uretan eta jarraian ur hotzetan sartu ziren 5 minutuz. Gero, 1 mL fosfo-vanillina erreaktiboa (Sigma - Aldrich, Japonia) gehitu zitzairen, nahastu egin ziren eta 37 °C-ko ur-bainuan murgildu ziren 15 minutuz. Laginak 5 minutuz hoztu ziren eta azkenik espektrofotometrikoki (BioTek ELx 808; BioTek, Espainia) absorbantzia 570 nm-tan neurtu zen (De Coen eta Janssen, 1997). Oliba olioaren (Sigma - Aldrich, Japonia) kontzentrazio jakineko (minimoa 0 mg/ml oliba olio eta maximoa 200 mg/ml oliba olio) estandarrak prestatu ziren erreferentziatzeko zuzen patroia sortzeko. Lipidoen kontzentrazioa mg lipido/g zizare adierazi zen.

4.2.3.2 Karbohidratoen kuantifikazioa

Karbohidratoen kuantifikazioa De Coen eta Janssen (1997) -en protokoloaren arabera egin zen. Homogeneizatutik 100 µL hartu eta 2 mL-ko beste bial berri batean sartu ziren. Ondoren, %15eko azido trikloroazetikoaren (TCA) 100 µL gehitu zitzairen eta -40 °C-tan inkubatu ziren 10 minutuz. Gero, zentrifugatu egin ziren (Allegra X-R15; Beckman Coulter) (1500 bira/minutuko 5 minutuz eta 4°C-tan). Bialeetik gainjalkina hartu zen karbohidratoak kuantifikatzeko. Gainjalkin horretatik 100 µL lagin hartu ziren eta 2 µL fenol (Sigma - Aldrich, Japonia) eta 240 µL H₂SO₄ (%97) gehitu zitzairen.

Absorbantzia 490nm-tan neurtu zen espektrofotometrikoki (BioTek ELx 808; BioTek, Espainia). Erreferentzia bezala D-glukosa (Sigma - Aldrich, France) erabili zen eta kontzentrazio ezaguneko estandarrek prestatu ziren (minimoa 0 mg/mL D-glukosa eta maximoa 50 mg/mL D-glukosa) . Karbohidratoen kontzentrazioa mg karbohidrato/g zizare adierazi zen.

4.2.3.3 Proteinen kuantifikazioa

Karbohidratoen kuantifikaziorako erabilitako homogeneizatu berdina erabili zen. Baina, bialetik gainjalkina hartu beharrean, pellet-a hartu zen. Lehenengo eta behin, lagina diluituko da (1:5 diluzioa). Horretarako, 20 μ L lagin eta 80 μ L ur distilatu nahastu ziren. Ondoren, Bradford protokoloa jarraitu zen (Bradford, 1976), non 10 μ L lagin eta 250 μ L Bradford (Bio-rad reactives) erreaktibo nahastu ziren. Absorbantzia 630nm-tan espektrofotometrikoki (BioTek ELx 808; BioTek, Espainia) neurtu zen. Estandar bezala γ -globulina erabili zen (minimoa 0,125 mg/ml eta maximoa 2 mg/ml). Proteina kontzentrazioa mg proteina/g zizare moduan adierazi zen.

Lipidoen, karbohidratoen eta proteinen kontzentrazioekin, animali bakoitzaren zelulen energia kopurua (CEA) kalkulatu zen, zizareen erreserba materialen eduki energetikoa ezartzeko asmoz. Horrela, proteinen, lipidoen eta karbohidratoen konbustio entalpiak (24 KJ/g proteina, 17,5 KJ/g lipido eta 39.5 KJ/g karbohidrato, hurrenez hurren) kontutan hartuz kalkulatu zen poliketo bakoitzaren CEA (Gnaiger, 1983).

4.3 Analisi estatistikoak

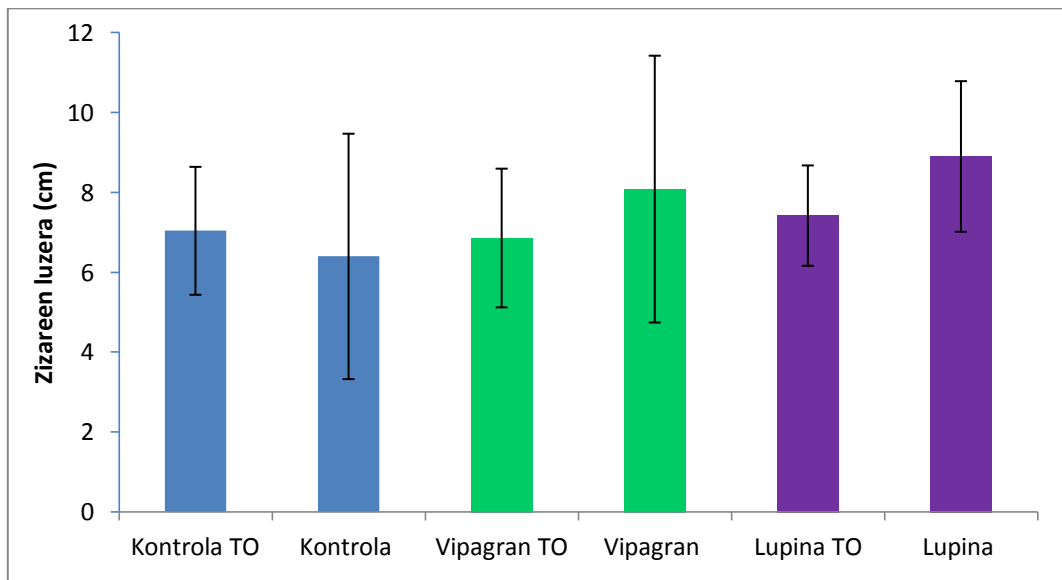
Emaitzen balioak aztertzeko eta hauen kalkulu matematiko eta estatistikoak burutzeko Excel eta SPSS v22 programak erabili ziren. Lehenik eta behin, datuak normalak ziren aztertu zen Kolmogorov-Smirnov frogaren bidez. Horrela, datuak normalak ez zirenean, Kruskal-Wallis test ez parametrikoa erabili zen taldeen arteko konparaketa egiteko. Jarraian Dunn's testa aplikatu zen populazioen arteko diferentziak ezartzeko. Bi populazio konparatu nahi zirenean Mann-Whitney U test ez parametrikoa erabili zen. Aldiz, datuak normalak zirenean, Student T-testa erabili zen. Kasu guztietan esangarritasun estatistikoa $p < 0,05$ balorean ezarri zen.

5. EMAITZAK

5.1 Dieta desberdinen eragina *H. diversicolor*-en tamainan eta pisuan

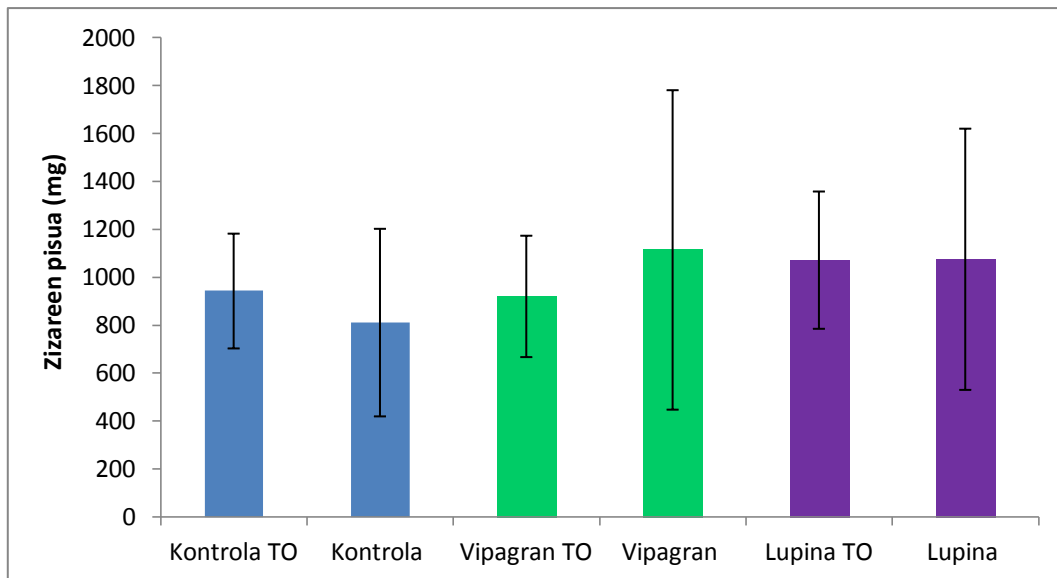
Esperimentua bukatu ondoren hurrengo emaitzak lortu ziren. Hasieran talde bakoitzean genituen 25 indibiduoetatik, kontrolean 5 indibiduok soilik biziraun zuten. *Vipagran*-ez elikatu zirenetan 6 indibiduok eta lupin pentsuaz elikatutakoan, 5 indibiduok.

Luzera aztertzerakoan (3 Irudia), lupin pentsuaz elikatutakoek zuten batzbeste luzera balio altuena, ondoren *Vipagran*-ez elikatutakoek eta kontroleko eta TO-ko zizareek zuten luzeerarik baxuena. Hala ere, hiru elikadura moten artean tendentzia bat ikusi arren, desberdintasunak ez ziren estatistikoki esangarriak (kasu honetan Kruskal-Wallis testaren ondoren).



3 Irudia. Zizareen luzera (cm) ezberdinen batzbestekoak eta desbiderapen estandarrak kontrol, *Vipagran* eta lupina pentsu elikadura motetan (baita bakoitzaren TOa ere).

Pisua aztertzerakoan (4 Irudia), *Vipagran*-ez elikatutakoek zuten batzbeste pisu balio altuena, ondoren lupin pentsuaz elikatutakoek eta azkenik kontrolekoek eta TO-koek. Hala ere, hiru elikadura moten artean tendentzia bat ikusi arren, desberdintasunak ez ziren estatistikoki esangarriak (kasu honetan, Kruskal-Wallis testaren ondoren).



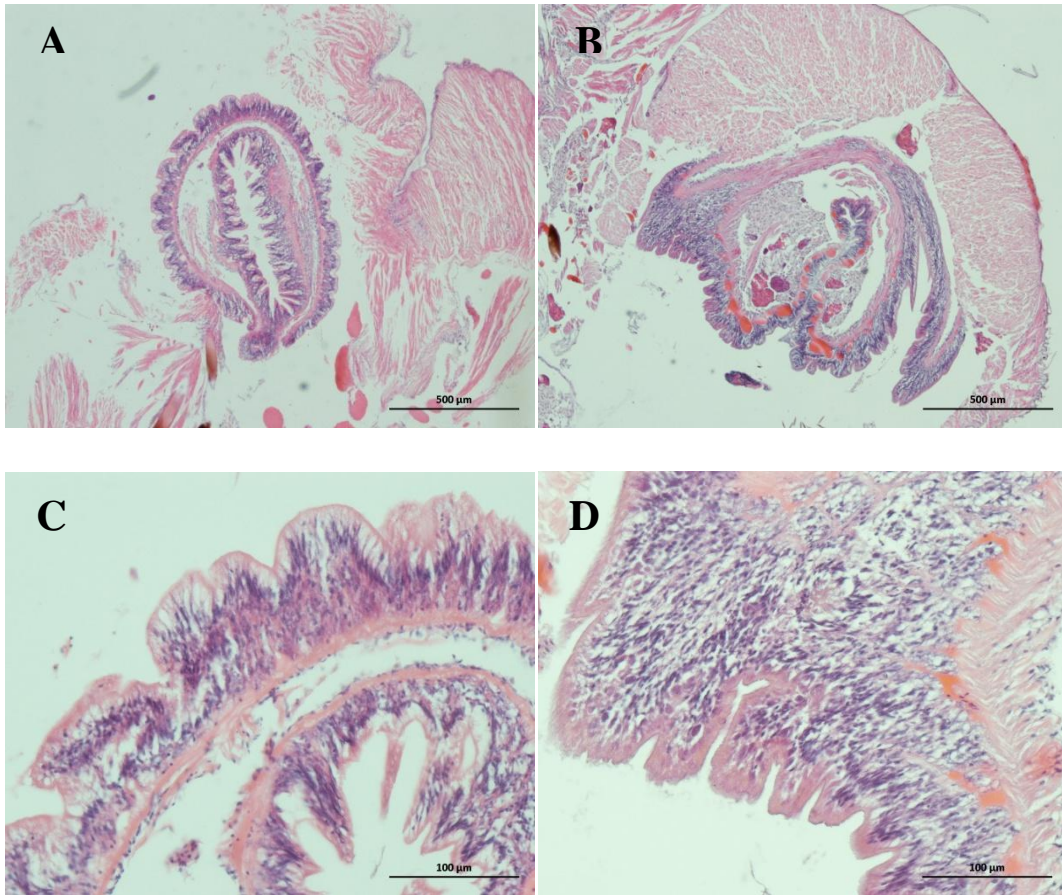
4 Irudia. Zizareen pisu (mg) ezberdinen batzbestekoak eta desbiderapen estandarrak kontrol, *Vipagran* eta lupina pentsu elikadura motetan (baita bakoitzaren TO-ak ere).

5.2 *H. diversicolor* bi populazioen (haztegikoa eta basatia) konparaketa biokimikoa eta histologikoa.

5.2.1 Azterketa histologikoak

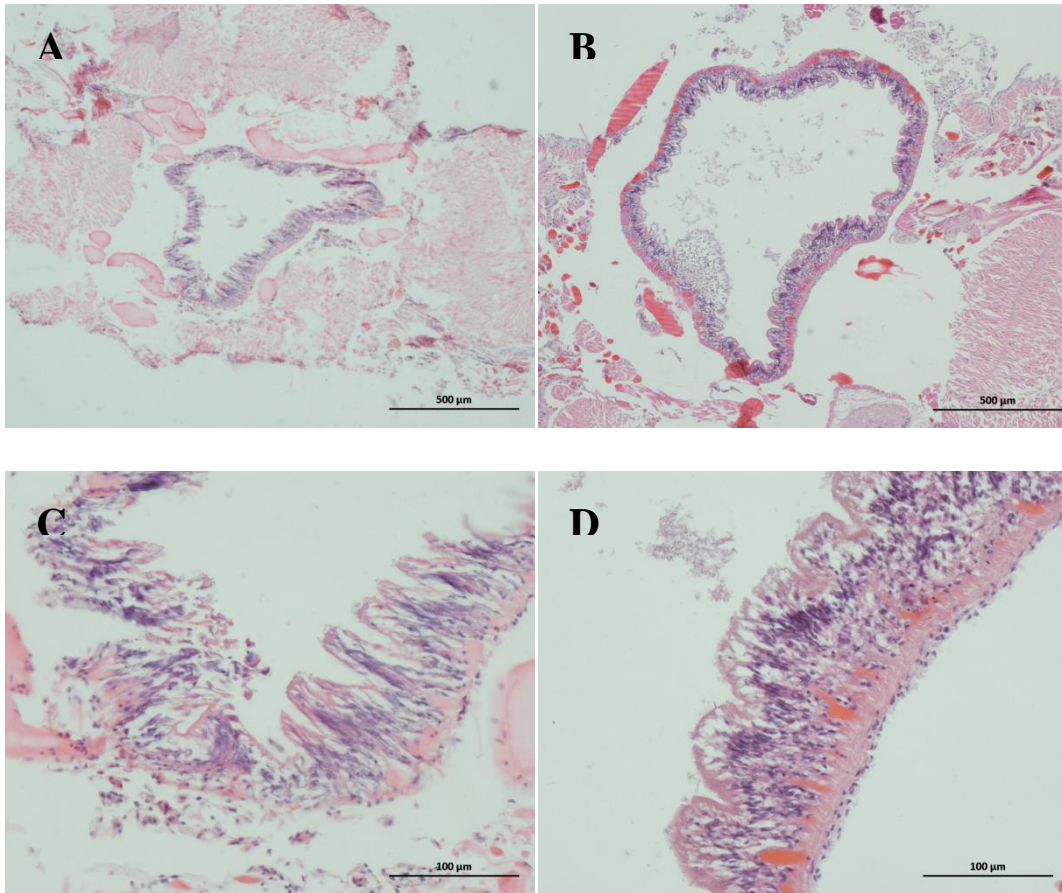
Laginen prozesamendu, tindaketa eta behaketaren ondoren, laginen sekzio ezberdinen arteko konparaketa burutu zen eta ondoren, laginen bi multzoek orokorrean zituzten desberdintasunak aztertu. Azterketa histologikoetan desberdintasunak behatzeko, digestio traktua aztertu zen batez ere (5 Irudia, 6 Irudia eta 7 Irudia).

Zizareen aurre aldeari dagokionez (S1), digestio traktuaren morfologian ezberdintasunak behatu ziren basati eta haztegikoen artean, haztegikoen digestio traktuaren epitelioak itxura sendoagoa zuen, argia beteagoa azaltzen zen eta basatietan apenas azaltzen ez ziren zenbait gorputz eosinofilo erakusten zituzten (5 Irudia).



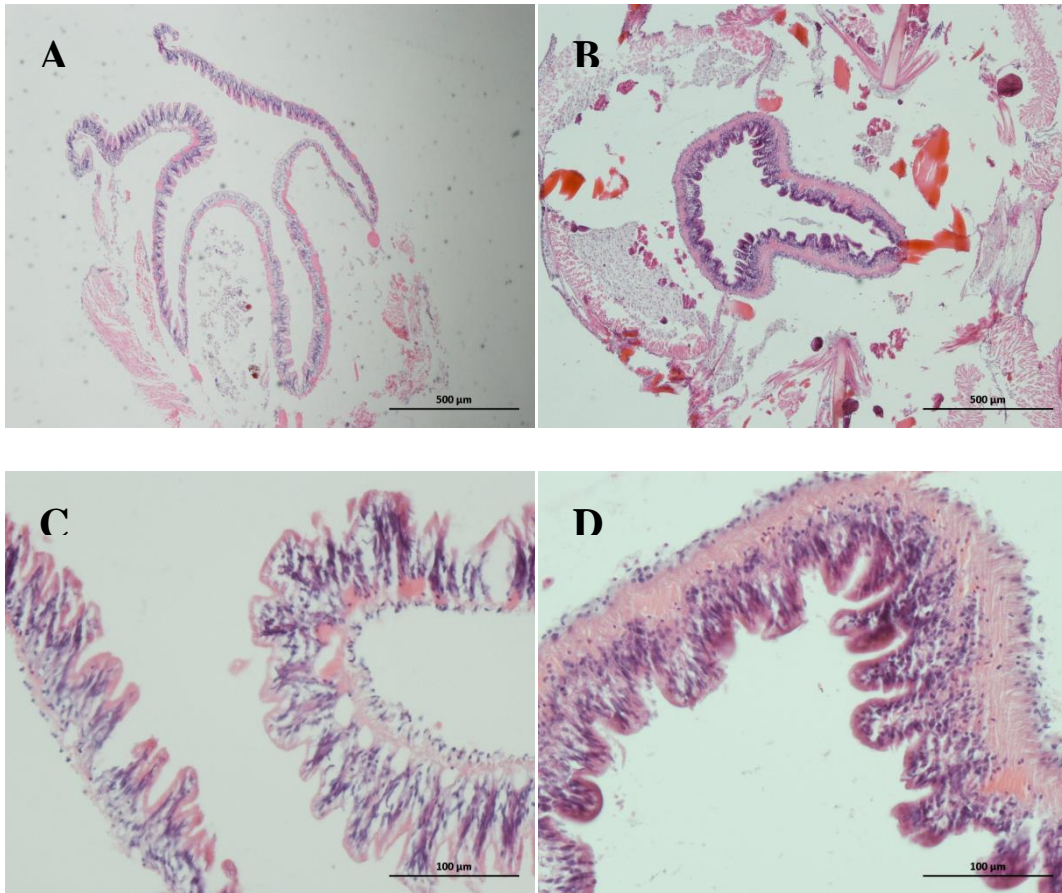
- 5 Irudia.** Zizare basati eta haztegikoen digestio traktuko irudi mikroskopikoak zizarearen aurre aldean (S1) ; A eta C zizare basatiak dira eta B eta D haztegikoak.

Zizareen erdiko aldeari dagokionez (S2), desberdintasunak behatu ziren basati eta haztegikoen artean (6 Irudia). Haztegikoetan, digestio-traktu zabalagoa ikusi zen, hau da, azalera handiagoa betetzen zuen. Eta hauek, itxura sendoagoa zuten; izan ere, basatietan digestio-traktuaren epitelioa nahiko mehea zen. Beste alde batetik ere aipatu beharra dago haztegiko zizareetan S1-ean gertatu bezala, hainbat gorputz eosinofilo azaltzen zirela.



6 Irudia. Zizare basati eta haztegikoen digestio traktuko irudi mikroskopikoak zizarearen erdi aldean (S2) ; A eta C zizare basatiak dira eta B eta D haztegikoak.

Zizareen atzealdeari dagokionez (S3) ere, desberdintasun nabariak ikusi ziren basati eta haztegikoen artean (7 Irudia). Atzealde honetan, digestio traktuaren sendotasuna askoz nabariagoa zen, hau da, basatietan digestio traktu oso mehea behatu zen eta haztegikoek, aldiz, nabarmenki lodiagoa zeukaten.

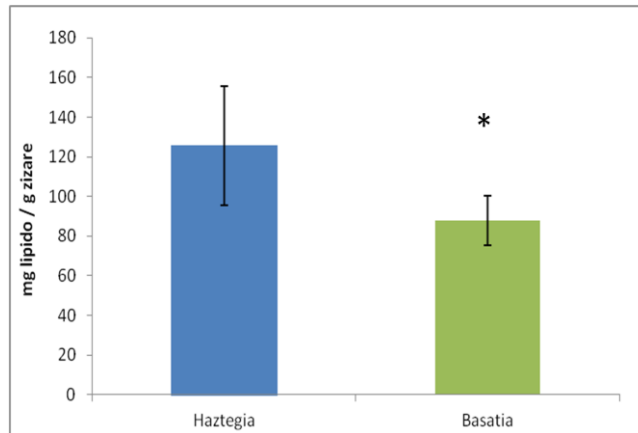


- 7 **Irudia.** Lagin basatien eta haztegiokoan arteko konparaketa, zizarearen atze aldean (S3); A eta C zizare basatiak dira eta B eta D haztegiakoak.

5.2.2 Azterketa biokimikoak

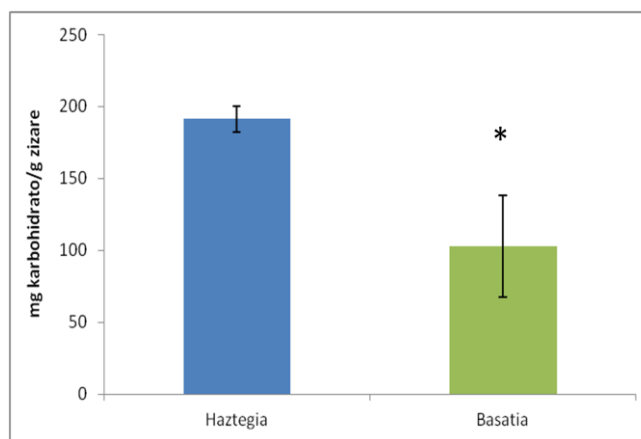
Zelulen energi kopurua (CEA) aztertzeko, lipidoak, karbohidratoak eta proteinak neurtu ziren, bai lagin basatietan eta haztegiokoetan. Orokorrean, indibiduoek karbohidratoak zituzten kontzentrazio altuagoan, ondoren lipidoak eta azkenik proteinak.

Lipidoei dagokienez (8 Irudia), zizareen bi populazioetan, desberdintasun estatistikoki esangarriak aurkitu ziren. Haztegioko zizareen lipido kontzentrazioa, zizare basatiarena baino handiagoa izan zen.



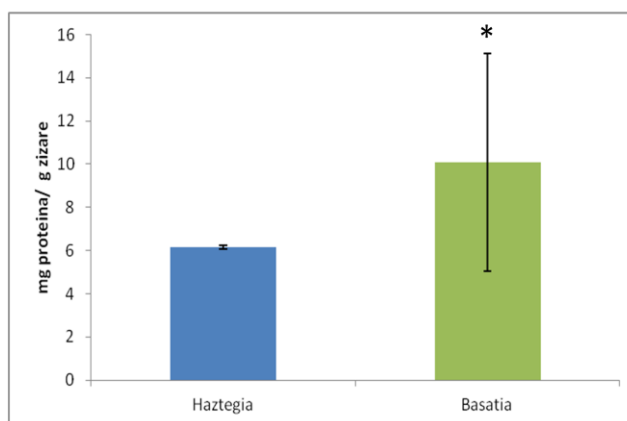
8 Irudia. Haztegiko zizare eta zizare basatien lipido kontzentrazioen (mg lipido/ g zizare) kopuruen batzbestekoak eta desbiderapen estandarrak. Izartxoek (*) bi populazioen arteko desberdintasunak estatistikoki esangarriak direla adierazten dute, $p < 0,05$ mailan (Student t-testaren ondoren).

Karbohidratoei dagokienez ere (9 Irudia), zizareen bi populazioetan, desberdintasun estatistikoki esangarriak aurkitu ziren. Haztegiko zizareen karbohidrato kontzentrazioa, zizare basatiena baino handiagoa izanik.



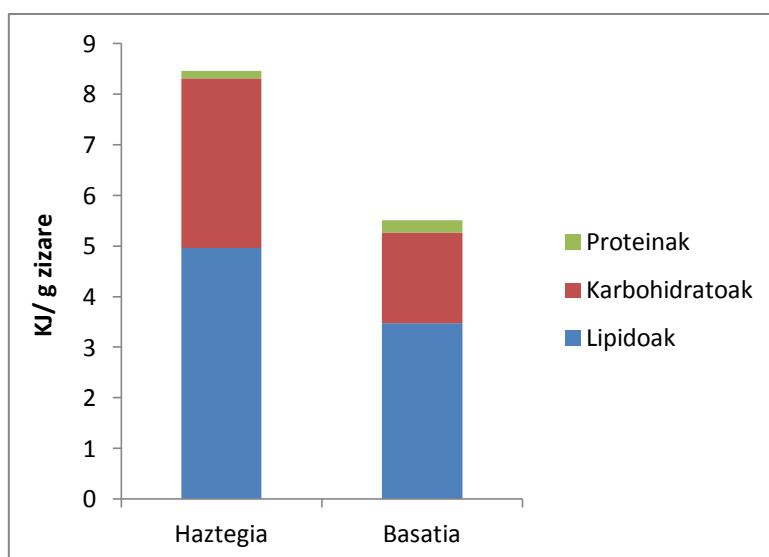
9 Irudia. Haztegiko zizare eta zizare basatien karbohidrato kontzentrazioen (mg karbohidrato/ g zizare) batzbestekoak eta hauen desbiderapen estandarrak. Izartxoek (*) bi populazioen arteko desberdintasunak estatistikoki esangarriak direla adierazten dute, $p < 0,05$ mailan (Student t-testaren ondoren).

Proteinei dagokienez (10 Irudia), zizareen bi populazioetan, desberdintasun esangarriak zeuden. Zizare basatien proteina kontzentrazioa, haztegiko zizareena baino handiagoa izan zen.



10 Irudia. Haztegiko zizare eta zizare basatien proteina kontzentrazioen (mg proteina/ g zizare) batzbestekoak eta hauen desbiderapen estandarrak. Izartxoek (*) bi populazioen arteko desberdintasunak estatistikoki esangarriak direla adierazten dute, $p < 0,05$ mailan (U testaren ondoren).

Balio energetikoari dagokionez (11 Irudia), haztegiko indibiduoek, basatiek baino CEA gehiago zuten. Gainera, bi populazioetan CEA honen proportziorik altuena lipidoek betetzen zuten, gero karbohidratoek eta azkenik proteinek.



11 Irudia. Proteina, karbohidrato eta lipidoek haztegiko zizare eta zizare basatietan daukaten balio energetikoaren proportzioa.

6. EZTABAIDA

Lan honetan, *Hediste diversicolor* poliketo espeziean dieta ezberdinek daukaten eragina ikertu zen, espezie hau denbora tarte jakin batean esperimentu batean mantendu nahi izan ezker, dieta mota egokiena jakiteko asmoz. Esperimentu honetan ikusitako hilkortasuna nahiko altua izan zen. Hiru egoera esperimentaletan %76-80 bitarteko hilkortasuna eman zen. Jarraitu genuen esperimentu diseinua Moore and Dillon (1994) -ek proposatutakoa izan zen. Beraiek *H. diversicolor* gazteen bost indibiduo jarri zituzten 1 L-ko ontzietan. Gure kasuan, helduak izanik, larregizko indibiduoak suertatu ziren. Honen arrazoi posiblea da ontzien tamaina txikiegia izatea 25 indibiduorentzat eta baita indibiduen borrokak eta kanibalismoa (Batista *et al.*, 2003).

Zizareen espazioa eta indibiduo ezberdinen arteko harremanak kontutan hartuta ere, egin ziren hurrengo ikerketak, zizare natibo edo basatien eta haztegikoen artean desberdintasunak zeuden aztertzeke burutu ziren. Dietaren frogia esperimentalean lortutako emaitzak, ikerketan erabilitako zizareen jatorriaren (basati edo haztegiko) arabera, aldatuko liratekeen ondorioztatzeko, hau da, basati eta komertzialek joera eta portaera bera duten ikusteko (Ait Alla *et al.*, 2006; Díez *et al.*, 2009).

Kontrolaren (elikagai gehigarrien eza), *Vipagran*-ez elikatzen zirenen eta lupina pentsuaz elikatzen ziren espezieen arteko desberdintasuna ez zen esangarria izan, ez luzerari, ezta pisuari dagokionez. Hala ere, emaitzetan tendentzia bat ikus daiteke bi parametroetan: luzerari dagokionez lupina pentsuaz elikatutakoak izan ziren luzeenak eta pisuari dagokionez, *Vipagran*-ez elikatutakoak pisu altuena zutenak. Beraz, kontutan hartu beharko litzateke zizare populazio osoaren kopuru txikia geratu zela esperimentuaren amaieran, eta horrek emaitzak antzekoagoak izatea ekartzen duela. Zizare kopuru altuagoa izan ezker, tendentzia hori markatuagoa izango litzatekelarik. Fidalgo e Costa *et al.* (2000) -ek burututako azterketetan, haztegiko *H. diversicolor* indibiduoek 6 dieta ezberdinen aurreko erantzunak aztertu ziren (*Artemia*, bisiguentzako janaria, *Lansy*, *Tetramin*, soja eta polena), non dieta guztiekin biziraupen-tasa altuak lortu ziren, baina dieta bakoitzaren arabera hazkuntza tasa ezberdina izan zen. Bestetik, Batista *et al.* (2003) -ek egindako ikerketan, *H. diversicolor*-en indibiduo gazteak erabili ziren dieta aztertzeke asmoz, *S. auratus* eta Tetramin® bidezko dietak erabiliz, eta ez zen estatistikoki desberdintasun esangarririk ikusi bi dieten artean. Beraz, etorkizunera begira, dietaren inguruko azterketa sakonagoak egitea interesgarria izango litzateke, baldintza esperimentalak (zizare dentsitatea, espazioa, zizare adina ...) optimizatuz.

Azterketa histologikoei dagokienez, lehenengo eta behin kontutan hartu behar zen, gorputzaren atal bakoitzak funtzio ezberdinak izanik, forma ezberdina izango zutela burutu beharrekoari moldatzeko asmoz. Honela, hasierako partea indartsuagoa da liseritu gabeko elikagaiak

atzeko gunetara garraiatu ahal izateko eta atzekaldean digestio-traktuak hainbat tolesdura azaltzen ditu bere kontaktu-azalera emendatuz eta modu horretan digestioa efizienteagoa bilakatuz.

Ikerlan honetan digestio-traktuaren morfologian zentratu bagara ere, lagin basati eta haztegioko arteko ezberdintasun nabariak, aniztasun handia dagoela demostratzen dute. Hau arrazoi ezberdinen ondorio izan daitekeelarik; esate baterako, zizareen habitata ezberdina delako eta ondorioz, espezie berdina izan arren, habitat bakoitzera moldatutako morfologia izatea delako ohikoena. Gainera, dibertsitate morfologikoaz gain, orokorrean haztegioko indibiduoek epitelio lodiagoa zuten, eta honek dietarekin eta ondoren azalduko den energiarekin lotura izan dezake; izan ere, indibiduo komertzialak hazkuntzarako baldintza egokietan bizi direnez eta modu erregularrean elikatzen direnez, energia gehiago bideratu ahal izango dute beraien organismoa modu egokian mantentzera. Basatiek, aldiz, baldintza erregular hauek ez izatean, epitelio meheagoa izango dute edo behintzat aldakortasun handiagoa erakutsiko dute. Fidalgo e Costa *et al.* (2000) -ek egindako ikerketan ere, hazkuntza tasa altuagoak lortu ziren baldintza kontrolatupean, hau da, haztegietan hazitako indibiduoetan, indibiduo basatietan baino.

Bestetik, azterketa biokimikoei dagokienez, desberdintasunak zeuden neurtutako parametro ezberdinei dagokienez (lipido, karbohidrato eta proteinak). Haztegioko indibiduoek basatiek baino lipido eta karbohidrato kopuru altuagoak zituzten, baina zizare basatietan proteina kopurua altuagoa zen.

Dieten lipido profilak zizareen biziraupen eta hazkuntza prozesuetan garrantzia handia dauka laborategiko esperimentuetan (Fidalgo e Costa *et al.*, 2000) ; beraz, hori dela eta, haztegioko zizareen dietak lipido kopuru altuagoa izango du, haztegioko zizareen lipido kopurua basatiena baino altuagoa izatea eraginez. Gainera, kontutan hartu behar da haztegietan, baldintzak konstante mantentzen direla eta indibiduo natiboen kasuan, aldiz, hainbat faktoreren ondorioz (esate baterako, itsasaldiak, eguraldia, tenperatura e.a.) zizareek jasan beharreko baldintzak aldatzen dira, beraien gorputzeko parametro biokimikoak baxuagoak izatea eraginez. Horregatik, haztegioko zizareek, indibiduo basatiek baino eskuragarri dagoen energia balio altuagoa dute.

Bestetik, kutsatzaileek eragindako estresak, mantentzeko beharrezkoa den energia beharra emendatuko du eta ondorioz, hazkuntza eta ugalketarako eskuragarri dagoen energia gutxituko da. Beraz, indibiduoek kutsatzaileen kontzentrazio ezberdinekiko esposizioa edukitzeak, orokorrean energia (CEA) murriztuko du (De Coen eta Janssen, 1997). Hori dela eta, nahiz eta Plentziako itsasadarra orokorrean garbitzat jo daitekeen (Solaun *et al.*, 2013) ezin dugu guztiz baztertu zizare basatiek beharbada kutsatzaileekiko esposizioa izan dutela beraien habitatean eta horrek beraien energia kopurua txikiagoa izatea eragin duela. Izan ere, poliketoei jada erakutsi dute azalera ari diren konposatu hauen aurreko azterketetan bioadierazle oso erabilgarriak direla (Galloway *et al.*, 2010; Lewis eta Watson, 2012).

7. ONDORIOAK

- ❖ *Hediste diversicolor* poliketoek tamainan eta pisuan hazteko joera erakutsi zuten arraintzako dieta komertzialekin elikatzerakoan. Hala ere, baldintza esperimentalak nabarmenki hobetu beharra dago laborategian poliketo hauek epe luzean mantendu ahal izateko.
- ❖ Haztegiko *H. diversicolor* poliketoek Plentzian hartutako poliketo populazio basatiak baino heste epitelio garatuagoa erakutsi zuten, ziur asko etengabeko janari eskuragarritasunaren ondorioz. Lipido eta karbohidrato maila altuagoak ere erakutsi zituzten. Honek ekarri zuen haztegiko poliketoek CEA altuagoa ere erakustea.
- ❖ Haztegiko poliketoak aukera egokia izan daitezke etorkizunean toxikologiazko laborategi esperimentuak egin nahi izatekotan.

8. BIBLIOGRAFIA

Ait Alla A., Gillet P., Deutsch B., Moukrim A. eta Bergayou H., 2006. Response of *Nereis diversicolor* (Polychaeta, Nereidae) populations to reduced wastewater discharge in the polluted estuary of Oued Souss, Bay of Agadir, Morocco. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 70: 633-642.

Arias Isaza F.A., 2003. Manual de técnicas analíticas para la determinación de parámetros físicoquímicos y contaminantes marinos (aguas, sedimentos y organismos). Invemar.

Banta G.T. eta Andersen O., 2003. Bioturbation and the fate of sediment pollutants. Experimental case studies of selected infauna species. *Vie et Milieu* 53: 233-248.

Barnes R.D., 1985. Zoología de los invertebrados. 4. edición. Editorial Interamericana S.A. México. D.F. 1159 orr.

Batista, F.M., Costa, P.F.E., Matias, D., Joaquim, S., Massapina, C., Passos, A.M., Pousao Ferreira, P., Cancela da Fonseca, L., 2003. Preliminary results on the growth and survival of the polychaete *Nereis*

diversicolor (O. F. Müller, 1776), when fed with faeces from the carpet sheel clam *Ruditapes decussates* (L., 1758). Boletín Instituto Español de Oceanografía 19: 443–446.

Blaise C., Gagné F., Gillis P.L., Eullafroy P., 2013. Polychaetes as bioindicators of water quality in the Saguenay Fjord (Quebec, Canada): a preliminary investigation. Journal of Xenobiotics 3: 1-2.

Brusca R.C. eta Brusca G.J., 2005. Invertebrados 2da edición. Mc Graw-Hill/Interamericana de España, S. A. 1005 orr. (Traducción de la versión en inglés de 2003).

Belzunce M.J., Solaun O., González Oreja J.A., Millán E. eta Pérez V., 2004. Contaminants in sediments. Borja A. and Collins, M. (Eds.) Oceanography and Marine Environment of the Basque Country, Elsevier Oceanography Series 70: 283-315, Elsevier, Amsterdam.

Benedetti M., Ciapriani F., Piva F., Onorati F., Fattorini D., Notti A., Ausili A. eta Regoli F., 2012. A multidisciplinary weight of evidence approach for classifying polluted sediments: Integrating sediment chemistry, bioavailability, biomarkers responses and bioassays. Environment International 38: 17-28.

Benito J., Odriozola J.C., Iglesias J.I. eta Altonaga J.K., 1982. Anelidoak eta talde anelidianoak. Udako Euskal Unibertsitatea.

Bradford M.M. , 1976. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. Analytical Biochemistry 72: 248-254.

Burton G.A., 2002. Sediment quality criteria in use around the world. Limnology 3: 65–75.

Cajaraville M. P., Bebianno M.J., Blasco J., Porte C., Sarasquete C. eta Viarengo A., 2000. The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: a practical approach. The Science of the Total Environment 247: 295-311.

Cardoso P.G., Lillebø A.I., Lopes C.B., Pereira E., Duarte A.C. eta Pardal M.A., 2008. Influence of bioturbation by *Hediste diversicolor* on mercury fluxes from estuarine sediments: A mesocosms laboratory experiment. Marine Pollution Bulletin 56: 325–334.

Day J. W., Charles A. S. H., Kemp Dr. W. M. eta Yáñez-Arancibia A., 1989. Estuarine ecology. John Wiley & Sons, Inc. 568 orr.

De Coen, W. M. eta Janssen, C. R., 1997. The use of biomarkers in *Daphnia magna* toxicity testing. IV. Cellular Energy Allocation: A new methodology to assess the energy budget of toxicant-stressed *Daphnia* populations. *Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery* 6 (1): 43–55.

Díez I., Santolaria A., Secilla A. eta Gorostiaga J.M., 2009. Recovery stages over a long-term monitoring of the intertidal vegetation in the 'Abra de Bilbao' area and on the adjacent coast (N. Spain). *European Journal of Phycology* 44 (1): 1 -14.

Durou C., Smith B. D., Roméo M., Rainbow P. S., Mouneyrac C., Mouloud M., Gnassia-Barelli M., Gillet P., Deutsch B. eta Amiard-Triquet C., 2007. From biomarkers to population responses in *Nereis diversicolor*: Assessment of stress in estuarine ecosystems. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 66: 402-411.

Durou C., Mouneyrac C. eta Amiard-Triquet C., 2008. Environmental quality assessment in estuarine ecosystems: use of biometric measurements and fecundity of the ragworm *Nereis diversicolor* (Polychaeta, Nereididae). *Water Research* 42: 2157-2165.

Fidalgo e Costa P., 1999. Reproduction and growth in captivity of the polychaete *Nereis diversicolor* O. F. Müller, 1776, using two different kinds of sediment: Preliminary assays. *Boletín Instituto Español de Oceanografía* 15 (1-4): 351-355.

Fidalgo e Costa P., Narciso L. eta Cancela da Fonseca L., 2000. Growth, survival and fatty acid profile of *Nereis diversicolor* (O. F. Müller, 1776) fed on six different diets. *Bulletin of marine science* 67(1): 337–343.

Fox R., 2007. *Nereis virens* ragworm. *Invertebrate Anatomy OnLine*.

Galloway T.S., Lewis C., Dolciotti I., Johnston B.D., Moger J., Regoli F., 2010. Sublethal toxicity of nano-titanium dioxide and carbon nano tubes in a sediment dwelling marine polychaete. *International Journal of Environment and Pollution* 158: 1748–1755.

Gnaiger, E., 1983. Appendix C Calculation of energetic and biochemical equivalents of respiratory oxygen consumption. In Forstner G (ed) *Polarographic Oxygen Sensors*. Springer-Verlag, Heidelberg.

<http://ramdigestivesystem.weebly.com/ragworms-nereididae.html> . 2015eko ekainaren 22an sartua.

http://aprendiendocondaniela1.blogspot.com.es/2014_06_01_archive.html 2015eko ekainaren 15ean sartua.

Iza J.B., Odriozola Pereira J.C., Ignacio J., Iglesias P. eta Altonaga J.K., 1982. Anelidoak eta talde anelidianoak. Udako Euskal Unibertsitatea.

Kennish M.J., 2002. Environmental threats and environmental future of estuaries. *Environmental Conservation* 29: 78-107.

Lewis C., Watson G.J., 2012. Expanding the ecotoxicological tool box: the inclusion of polychaete reproductive end points. *Marine Environmental Research* 75: 10–22.

Macrae K.J., 2009. Effects on cellular energy allocation and total oxyradical capacity in contamination exposed *Arenicola marina*. Master thesis, University of Oslo, Norway, 69 orr.

Moore D.W. eta Dillon T.M., 1994. Chronic sublethal effects of San Francisco Bay sediments on *Nereis (Neanthes) arenaceodentata*; full life-cycle exposure to bedded sediments. Miscellaneous paper D-93-2, U.S. Army Engineer Waterways Experiment Station, Vicksburg, MS.

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

Solé M., Kopecka-Pilarczyk J. eta Blasco J., 2009. Pollution biomarkers in two estuarine invertebrates, *Nereis diversicolor* and *Scrobicularia plana*, from a Marsh ecosystem in SW Spain. *Environment International* 35: 523-531.

World Register of Marine Species, 2015. WoRMS www.marinespecies.org 2015eko ekainaren 10ean sartua.