



IKER
GAZTE
NAZIOARTEKO
IKERKETA EUSKARAZ

VI. IKERGAZTE

NAZIOARTEKO IKERKETA EUSKARAZ

2025eko maiatzaren 28, 29 eta 30a
Bilbo, Euskal Herria

ANTOLATZAILEA:
Udako Euskal Unibertsitatea (UEU)



Aitortu-PartekatuBerdin 4.0

ZIENTZIAK ETA NATURA ZIENTZIAK

**Nanoplastikoek muskuiluetan
eragin ditzaketen kalteak: berezko
aldakortasuna eta toxikotasuna
bereiztearen erronka**

*Nagore González-Soto,
Tania Ramírez, Tamer Hafez,
Marisa Sarriá Pereira de Passos,
Eider Bilbao, Amaia Orbea,
Douglas Gilliland,
Miguel-Ángel Serra eta
Miren P. Cajaraville*

227-234 or.
<https://dx.doi.org/10.26876/ikergazte.vi.05.28>

ANTOLATZAILEA



BABESLEAK



EUSKO JAURLARITZA
GOBIERNO VASCO



LAGUNTZAILEAK



Nanoplastikoen muskuiluetan eragin ditzaketen kalteak: berezko aldakortasuna eta toxikotasuna bereiztearen erronka

Nagore González-Soto^{1,2}, Tania Ramírez¹, Tamer Hafez¹, Marisa Sarriá Pereira de Passos³, Eider Bilbao¹, Amaia Orbea¹, Douglas Gilliland³, Miguel-Ángel Serra³, Miren P. Cajaraville¹

¹ZBIT+ ikerketa taldea, Zoologia eta Animalia Zelulen Biologia Saila, Zientzia eta Teknologia Fakultatea, Plentziako Itsas estazioa (PiE-UPV/EHU) Euskal Herriko Unibertsitatea (UPV/EHU), Leioa, Euskal Herria.

²EPOC UMR 5805 Bordeleko Unibertsitatea, CNRS, Bordele, Akitania Berria.

³Europako Batzordea, JRC, Ispra, Lombardia.

nagore.gonzalez@ehu.eus

Laburpena

Mikroplastikoen (MP, ≤ 1 mm) itsas organismoetan eragin ditzaketen kalteen inguruko informazioa nabarmenki handitu da azken urteotan, baina nanoplastikoei buruzkoa (NP, ≤ 1 μ m) askoz urriagoa da. Itsas ingurunean poliestirenozko (PS) MP eta NPak oso hedatuta daudenez, garrantzitsua da eragin ditzaketen kalteak zehazki ezagutzea. Muskuiluak, maiz erabiltzen dira organismo behale moduan, besteak beste, iragazleak direnez, MP eta NP moduko kutsatzaileak barneratu ditzazketelako. Lan honen helburua da dietara gehitutako PSzko 3 tamaina ezberdindun NPek (50, 200 eta 1000 nm) muskuiluetan eragin ditzaketen kalteak aztertzea: bai beraien sistema immunean, ehunetan eta organismo mailan.

Hitz gakoak: Poliestirenozko nanoplastikoak, dieta bidezko esposizioa, muskuiluak, kalte histopatologikoak, hemozitoen erantzunak, ugaltze egoera

Abstract

The evidence of the harmful effects of microplastics (MPs, ≤ 1 mm) on marine organisms has greatly increased in the last years, but information regarding the impact of nanoplastics (NPs, ≤ 1 μ m) is still insufficient. Given the widespread occurrence of polystyrene (PS) MPs and NPs in the marine environment, it is important to determine their potential adverse effects. Mussels are widely used sentinel organisms, among other reasons, because they can internalize particulate pollutants, such as, MPs and NPs, due to their filter-feeding ability. This work aimed to elucidate the differential toxicity of three sizes of PS NPs (50, 200 and 1000 nm) in foodborne exposed mussels' tissues, immune system and at whole organism level.

Keywords: Polystyrene nanoplastics, dietary exposure, mussels, histopathological alterations, hemocyte responses, reproductive status.

1. Sarrera eta motibazioa

Gaur egun, plastikoa planetako hondakin solido nagusia da (Seuront et al., 2022). Plastikoen ekoizpena, 2023an 413,8 milioi tonara iritsi zen eta ez da espero hurrengo urteotan ekoizpen maila honek behera egingo duenik (Plastics Europe, 2024). Hainbat modelo matematikoren arabera, gaur egun 30 milioi tona plastiko baino gehiago daude pilatuta ozeanoan, eta 100 milioi tona baino gehiago ibaietan; horiek ere itsasoetan bukatu dezaketenak hurrengo hamarkadetan. Honek ekosistemak kaltetu ditzake hainbat eskalatan (OECD's Global Plastic Outlook, 2022, Martin et al., 2022).

Itsasora iristen diren plastikoen fragmentazioak partikula txikiagoak sortarazten ditu. Azken urteotan, gero eta gehiago erreparatzen zaie plastikozko partikula txikiei, mikro (MP, <1 mm) eta nanoplastikoei

(NP, $<1\ \mu\text{m}$), hain zuzen ere. Batez ere, NPek sortu ditzaketen kalteei buruzko kezka gero eta handiagoa da. Plastikoen handiek, hau da, meso (1-10 mm) eta makroplastikoen ($>1\ \text{cm}$) itsas organismoetan eta bereziki, animalietan eragiten dituzten kalteen artean, itotzea, korapilatzea eta hesteetako buxadura azpimarratzen dira (Barboza et al., 2019). MPen eta NPen eraginak ordea, zuzenak ez ezik, ez-zuzenak ere izan daitezke, eta ez dira guztiz ezagunak (Provenza et al., 2022). Laborategian burututako esperimenduetan ikusi da MPek eta NPek hainbat animalia urtarretan kalteak eragin ditzaketela, zelula mailan hasi eta organismo mailara iritsi arte (De Sá et al., 2018).

Eragin hauek plastikoen tamainaren menpekoak izan daitezkeela uste da, eta honek, NPen inguruko kezka areagotu egin du (Han et al., 2022). Gainera, egun itsasoan dagoen NPen kontzentrazioa ezezaguna da, NPak detektatzeko eta kuantifikatzeko metodologia sendo eta estandarizatuak falta baitira (Dang et al., 2022; Reynaud et al., 2022); baina ordenagailu bitartez egindako ereduetan 300 miloi tona NP baino gehiago daudela estimatu da (Dang et al., 2022).

2. Arloko egoera eta ikerketaren helburuak

Plastikoen tamainak beraien ezaugarri fisiko-kimikoak baldintzatzen ditu eta nabarmen eragiten du plastikoen beraien artean zein inguruneke beste partikulekin eta organismoekin izango dituzten elkarrekintzetan (Kokilathasan & Dittrich, 2022; Dang et al., 2022; Ziani et al., 2023). Hori dela eta, itsas organismoentzat NPak MPak baino arrisku potentzial handiagoa izatea espero da (Gong et al., 2023). Izan ere, itsas animalietan, MPak digestio aparatutik sartzen dira batez ere, eta hauen proportzio bat hestean harrapatuta geratzen den arren, asko, gorotzekin batera kanporatzen dira. NPek, berriz, beraien tamainagatik mintz biologikoak zeharkatzeko gaitasun handiagoa dute eta hori dela eta, luzeago mantendu ahal dira gorputz barnean (Dang et al., 2022). Hori dela eta, NPek sortu ditzaketen kalteak zelula-mailan ikusi dira batez ere; besteak beste, estres oxidatiboa, genotoxikotasuna, neurotoxikotasuna eta immunotoxikotasuna (Gonçalves & Bebianno, 2021; Dang et al., 2022). Ehun eta organismo mailan, MPek eta NPek hantura moduko erreakzioak, ugalketa kaltetzea eta heriotza eragin dezakete (De Sá et al., 2018; González-Soto et al., 2019; Dang et al., 2022).

Itsas organismoetan, MPen presentzia dokumentatu den bitartean, NPen presentzia ez da era eraginkorrean ezarri (Corsi et al., 2023). Balizko itu-organismoen artean, bibalbioak eta, zehazkiago, muskuiluak maiz azpimarratu dira MPen eta NPen toxikotasun-mekanismoak ulertzeko funtsezko organismo gisa (Li et al., 2019; Corsi et al., 2023). Muskuiluak laborategiko ikerketetan MPen efektu toxikoen erantzuleak diren mekanismoak identifikatzeko maiz erabili diren arren (Li et al., 2019; Cole et al., 2023), NPenak ez hainbeste. NPek muskuiluei eragindako efektuei buruz eskuragarri dagoen informazioa oraindik urria da, bereziki muskuiluek NPak dietaren bitartez jasotzen dituztenean (González-Soto et al., 2019; Gonçalves & Bebianno, 2021; Lu et al., 2023). NPen barneraketak muskuiluetan hantura moduko erantzunak eragin ditzake beraien ehunetan, muskuiluen sistema immuneak NPak patogenoekin nahastu ditzakelako (Dang et al., 2022). Gainera, NPak digestio aparatutik muskuiluen hemolinfa pasatu daitezkeela ikusi da (Sendra et al., 2020). Honek, maila ezberdineko kalteak eragin ditzake muskuiluen hemozitoetan, hau dau, beraien berezko immunitate-sistemaren zeluletan (Katsumi et al., 2021).

Lan honen hipotesia izan da, muskuiluek dietaren bitartez poliestirenozko (PS) NPak jasotzen dituztenean hainbat aldaketa pairatzen dituztela, zelula eta ehun mailatan. Gainera zenbat eta NPen dosia altuagoa izan eta NPen tamaina txikiagoa izan, kalte nabarmenagoak espero dira. Hipotesi hau egiaztatzeko asmoz, muskuiluei 7 egunehi hiru tamaina ezberdinetako NPak eman zitzaizkien (50, 200 eta 1000 nm) dietaren bitartez. Denbora hori pasa eta gero, alde batetik, zelula-mailan muskuiluen hemolinfatik isolatutako hemozitoetan NPek eragindako kalteak aztertu ziren eta, bestetik, ehun mailan digestio gurutzean eta gonadan NPek eragindako aldaketa histopatologikoak aztertu ziren. Horrekin batera, muskuiluen ugalketa zikloaren fasea eta parasitoen presentzia aztertu ziren aldagai nahasle gisa, muskuiluetan hantura eragiten dutelako (Villalba et al., 1997; Garmendia et al., 2011; Bignell et al., 2012; Carella et al., 2015). Azkenik, muskuiluen osasun-egoera orokorraren adierazle gisa, egoera-

indizea (ingelesezko, *condition index*) neurtu zen, ehunetako pisu hezearen (g) eta barne-barrunbearen bolumenaren (cm³) arteko erlazio gisa.

3. Ikerketaren muina

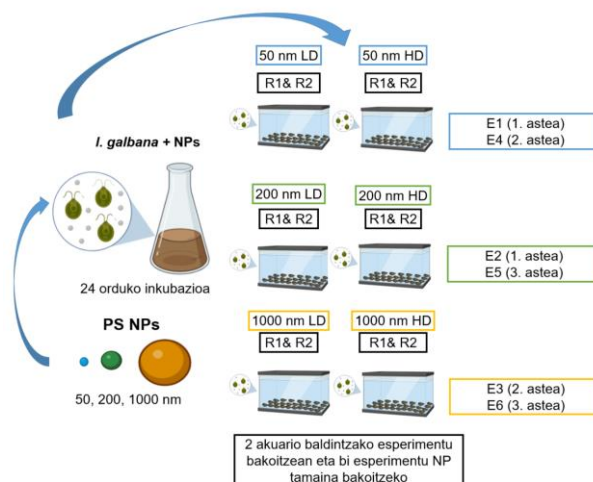
Mytilus galloprovincialis muskuiluak Angulas Anguinaga S.A.U.-k Porto do Son-en (42°44'31.4"N 8°59'16.7"W) (Galicia, Espainia) dauzkan akuikultura instalazioetatik lortu ziren 2022ko irailean. Muskuiluak Plentziako Itsas Estaziora (PiE-UPV/EHU) 3 txandetan heldu ziren. Guztira 6 esperimentu gauzatu ziren. Esperimentu bakoitza hasi baino lehen, muskuiluak 5 egunez egokitu ziren laborategiko baldintzetara. Esperimentuan zehar muskuiluak mikroalgekin (*Isochrysis galbana*, 20⁶ zelula/muskuiluko) bakarrik (kontrola) edo PSzko NPekin inkubatutako mikroalgekin elikatu ziren 7 egunez. NP denak biribilak ziren eta Polysciences etxe komertzialetik lortu ziren. Aukeratutako tamainak 50 nm, 200 nm eta 1000 nm izan ziren eta bakoitzaren bi dosi ezberdin erabili ziren, dosi baxua (LD) eta dosi altua (HD). 50 eta 200 nm-tako NPetarako dosi altua (HD) 10⁸ NP/mL izan zen eta 1000 nm-tako NPetarako 10⁶ NP/mL; dosi baxua (LD) 3 NPentzako 10³ NP/mL-takoa izan zen (1. irudia). Tratamendu bakoitzeko bi akuario prestatu ziren (erreplikak) eta esperimentu (E) bakoitza birritan burutu zen tamaina ezberdineko bi NP aldi berean ikertuz (1. irudia). Esperimentuen segida hurrengoa izan zen: E1) 50 nm-tako PSzko NPak, E2) 200 nm-tako PSzko NPak, E3) 1000 nm-tako PSzko NPak, E4) 50 nm-tako PSzko NPak, E5) 200 nm-tako PSzko NPak, E6) 1000 nm-tako PSzko NPak. Batera egindako esperimentuek (E1-E2, E3-E4, E5-E6) kontrola elkarbanatu zuten. E3 eta E4ko muskuiluek gametoak askatu zituzten esperimentua hasi aurretiko egokitzapen fasean.

7 egunen buruan, muskuiluetatik hemolinfra erauzi eta digestio guruina eta gonadak diseekzionatu ziren tratamendu ezberdinek eragindako kalteak aztertzeko. Muskuiluen hemozitoetan, zelulen bideragarritasuna, oxigenoaren espezie errektiboen (ROS) ekoizpena eta fagozitosi ahalmena ikertu ziren. Gainera, digestio guruinaren eta gonadaren azterketa histopatologikoa burutu zen, non besteak beste, hurrengo aldaketen prebalentziak neurtu ziren: hemozito eta zelula arreen metaketa, fibrosia, digestio hodien atrofia eta nekrosia, oozitoen atresia eta nekrosia. Organismo mailan, sexua, ugalketa zikloaren fasea, indize gonadala eta egoera-indizea zehaztu ziren. Esperimentu bakoitzaren barruan ez zen desberdintasunik aurkitu bi erreplika tankeen artean. Horregatik, bi erreplika tankeen datu-multzoak konbinatu eta elkarrekin analizatu ziren. Esperimentu bakoitzaren barruan, kontrol, LD eta HD arteko ezberdintasunak aztertu ziren. Baita, aldi berean NP tamaina ezberdinekin egindako esperimentuen arteko desberdintasunak aztertu ziren. Azkenik, tratamendu berbereko bi esperimentu independenteen arteko desberdintasunak aztertu ziren.

3.1 Hemozitoen bideragarritasuna eta beraietan neurtutako erantzunak

Kontrol muskuiluek aldakortasuna erakutsi zuten hemozitoen bideragarritasunean eta beraien erantzunetan, 3 muskuilu sortak alderatzean. Lehendabizi, E3-E4 eta E5-E6en kontrolen hemozitoek E1-E2en hemozitoek baino bideragarritasun baxuagoa erakutsi zuten (1.A. taula). Gainera, E3-E4ko kontrolen hemozitoek ROS ekoizpen altuagoa aurkeztu zuten E1-E2 eta E5-E6en kontrolen hemozitoek baino (1.A. taula).

Hori dela eta, NPen pean mantendutako muskuiluek ez zuten beti erantzun berdina erakutsi bi esperimentu independenteetan (1.B. taula). Adibidez, 50 nm-tako PSzko NPen tratamenduen pean mantendutako hemozitoen bideragarritasuna kontrolarekiko baxuagoa izan zen E1ean (bai LD zein HDra), baina ez E5ean (1.C. taula). Antzera, 50 nm-tako PSzko NPen HDren pean mantendutako hemozitoen fagozitosi ahalmena kontrolarekiko txikiagoa izan zen E1ean, baina ez E5ean (1.C. taula). Bestalde, 200 nmko PSzko NPen HD tratamenduaren pean mantendutako hemozitoen bideragarritasuna kontrolarekiko txikiagoa izan zen E2an, baina kontrakoa ikusi zen E5ean (1.C. taula).



1. irudia: esperimentuen diseinuaren irudikapen grafikoa. R: erreplika.

Beraz, tamainaren efektua aztertzeko, aldi berean gauzatutako esperimentuak alderatu ziren bakarrik. Ez zen ezberdintasunik aurkitu tratamendu ezberdinen pean mantendutako muskuiluen hemozitoen bideragarritasunean; baina 50 nm-tako PSzko NPen LDren pean mantendutako hemozitoen ROS ekoizpena 200 nm-tako PSzko NPen LDren pean mantendutako hemozitoena baino baxuagoa izan zen (1.D. taula). Gure emaitzekin bat eginez, Katsumiti et al. (2021) ikusi zuten 50 nm-ko PS NPen eraginpean egon ondoren muskuiluen hemozitoen hilkortasuna igotzen zela, baina ROS ekoizpena ez. Oro har, muskuiluen hemozitoetan ROSen ekoizpena erantzun goiztiarra dela dirudi, ordu gutxi batzuk bakarrik iraun lezakeena eta denbora hori pasa eta gero zelulak biziraupena txikitu egiten da (Katsumiti eta Cajaraville, 2019). Antzera, 50 nm-tako PSzko NPen HDren pean mantendutako hemozitoen fagozitosi ahalmena 200 eta 1000 nm-tako PSzko NPen HDren pean mantendutako hemozitoena baino txikiagoa izan zen (1.D. taula). Fagozitosia hemozitoen mekanismo nagusietako bat da beraien funtzio immunologikoak betetzeko eta hainbat lan erakutsi dute nola NPen pean egondako hemozitoen fagozitozi ahalmena kaltetu daitekela (Katsumiti et al., 2021).

3.2 Digestio guruinaren eta gonadaren azterketa histopatologikoa eta organismo mailako erantzunak

Muskuiluek NPen pean egon eta gero digestio-guruina aztertu zen NPak metatzeko organo nagusia delako (Gonçalves et al., 2023). Gonada baita ikertu zen, zeren gametoak kaltetzen baldin badira ondorioak populazio mailan izan daitezke. Muskuiluen digestio guruinaren azterketa histopatologikoan hantura motako erantzun ugari ikusi zen bai kontrolatan zein NPen pean mantendutakoetan. Kontrolak alderatzerakoan, E5-E6ko muskuiluek digestio tubuluen atrofia txikiagoa aurkeztu zuten E1-E2 eta E3-E4rekin alderatuta (2.A. taula).

NPen efektuak aztertzerakoan, 1000 nm-tako PSzko NPen LDren pean mantendutako muskuiluetan ikusi zen eragin nabariena. Hauek, E3an kontrolekin alderatuta digestio guruinean fibrosi eta nekrosi prebalentzia altuagoak erakutsi zituzten (2.C. taula). Gainera, 1000 nm-tako PSzko NPen LDak eragindako digestio hodien nekrosia altuagoa izan zen E3an E6an baino (2.B. taula). Esperimentuen arteko ezberdintasunak baita ikusi ziren 200 nm-tako PSzko NPen HDra, zeinak zelula arreen metaketa handiagoa eragin zuten E5an E2an baino (2.B. taula).

Gainera, aldi berean gauzatutako esperimentuak alderatzerakoan ikusi zen 200 nm-tako PSzko NPen HDren pean mantendutako muskuilueen zelula arreen metaketa E5an handiagoa izan zela 1000 nm-tako PSzko NPen HDren pean mantendutako muskuiluetan baino E6an (2.D. taula). Bestalde, 1000 nm-tako PSzko NPen LDren pean mantendutako muskuiluetan fibrosia eta digestio hodien nekrosi prebalentzia

altuagoa ikusi zen E3an 50 nm-tako PSzko NPen LDren pean mantendutako muskuiluekin alderatuz (E4an). Aldiz, 50 nm-tako PSzko NPen LDren pean mantendutako muskuiluetan digestio hodien atrofia altuago ikusi zen E4an 1000 nm-tako PSzko NPen LDren pean mantendutako muskuiluekin alderatuz (E3an) (2.D. taula). Digestio hodien atrofia digestio-zelulen galeraren ondorioz gertatu ohi da (Kim et al., 2006; Bignell et al, 2012). NP txikiagoak errazago sartu daitezke digestio-guruineko zeluletan, NP handiagoekin alderatuta (Wang et al., 2021). Beraz, ez da harritzekoa ikusi izana NP txikiak (50 nm) eragindako kalteak zeluletan sartu izanarekin lotu daitezkeela, eta aldiz NP handiak (1000 nm) eragindako kalteak, zelula artean gertatutako aldaketekin lotu daitezkeela.

Muskuiluen sorta ezberdinak alderatzerakoan, ez zen desberdintasunik aurkitu muskuiluen sexuen arteko proportzioan. Aldiz, ugalketa zikloaren faseak eta indize gonadala aztertzerakoan (3.A. taula) E3-E4ko aklimatazioan muskuiluak gametoak askatu izanaren efektua ikusi zen. E3-E4ko kontrol muskuilu emeen indize gonadala E5-E6ko muskuiluena baino baxuagoa izan zen (3.A. taula). E3-E4ko muskuilu ia denak gametoen askatze fasean zeuden. Aldiz, E1-E2 eta E5-E6etan gametoen askatze fasean zeuden muskuiluen proportzioa txikiago zen.

1. taula: hemozitoen estatistikoki esangarriak diren erantzunak laburbiltzen dituen taula. e.e.b.: ez da efekturik behatu. Partikula urdina: 50 nm; partikula berdea: 200 nm eta partikula laranja: 1000 nm.

	A.) Ezberdintasunak kontrolen artean	B.) Ezberdintasunak esperimentu independenteen artean	C.) Kontrolerikiko ezberdintasunak			D.) Tamaina ezberdineko NPen arteko ezberdintasunak, aldi berean egindako esperimentuetan
						
Zitotoxikotasuna	E3-E4, E5-E6 ↓ E1-E2	50 nm LD E1 ↑ E4 200 nm LD E2 ↑ E5	E1: 50 nm LD & HD ↓	E2: 200 nm HD ↓ E5: 200 nm HD ↑	E6: 1000 nm LD ↑	e.e.b
ROS ekoizpena	E3-E4 ↑ E1-E2, E5-E6	50 nm LD E1 ↓ E4 1000 nm LD & HD E3 ↑ E6	e.e.b	e.e.b	e.e.b	50 nm LD (E1) ↓ 200 nm LD (E2))
Fagozitosi ahalmena	e.e.b	1000 nm LD E3 ↓ E6	E1: 50 nm HD ↓	e.e.b	e.e.b	50 nm HD (E1)) ↓ 200 nm HD (E2) 50 nm HD (E4) ↓ 1000 nm HD (E3)

Orokorrean, digestio guruinean ikusitakoaren antzera, hanturarekin erlazionatutako kalte histopatologikoak behatu ziren ia muskuilu denen gonadan. NPen efektuak aztertzerako orduan ikusi zen 50 nm-tako PSzko NPen HDren pean mantendutako muskuiluek fibrosi-maila altuagoa erakusten zutela kontrolak baino E4an eta 1000 nm-tako PSzko NPen bai LD zein HDren pean mantendutako muskuiluek E3an (3.C. taula). Gainera, 1000 nm-tako PSzko NPen HDren pean mantendutako muskuiluek hemozitoen metaketa altuagoa aurkeztu zuten E3an (3.C. taula).

1000 nm-tako PSzko NPen HDren pean mantendutako muskuiluek E3an erakutsi zuten hemozitoen metaketa ez zen E6an ikusi, altuagoa izanik E3an E6an baino (3.B. taula). Era berean 1000 nm-tako PSzko NPen HDren pean mantendutako muskuiluek oozitoen nekrosi altuagoa azaldu zuten E3an E6arekin alderatu zenean eta kontrakoa ikusi zen zelula arreen metaketarako (3.B. taula). 200 nm-tako

PSzko NPen kasuan ez zen ezberdintasunik ikusi esperimentu independenteen artean (3.B. taula). Baina 50 nm-tako PSzko NPen kasuan, HDren pean mantendutako muskuiluek oozitoen atresia altuagoa azaldu zuten E5an E1an baino (3.B. taula). Aldi berean gauzatutako esperimentuak alderatzerakoan ikusi zen, E2an 200 nm-tako PSzko NPen HDren pean mantendutako muskuiluek oozitoen atresia eta nekrosi altuagoa aurkezten zutela E1an 50 nm-tako PSzko NPen HDren pean mantendutako muskuiluekin konparatuta (3.D. taula). Aldiz, E1ean 50 nm-tako PSzko NPen HDren pean mantendutako muskuiluek hemozitoen metaketa altuagoa aurkeztu zuten E2an 200 nm-tako PSzko NPen HDren pean mantendutako muskuiluekin konparatuta (3.D. taula). Baina E3 eta E4 alderatu zirenean, 1000nm-tako PSzko NPen HDak hemozitoen metaketa altuagoa eragin zuen muskuiluen gonadan 50 nm-tako PSzko NPen HDak baino (3.D. taula).

2. taula: digestio guruinaren azterketa histopatologikoan estatistikoki esangarriak diren emaitzak laburbiltzen dituen taula. e.e.b.: ez da efekturik behatu. Partikula urdina: 50 nm; partikula berdea: 200 nm eta partikula laranja: 1000 nm.

	A.) Ezberdintasunak kontrolen artean	B.) Ezberdintasunak esperimentu independenteen artean	C.) Kontrolerikiko ezberdintasunak			D.) Tamaina ezberdineko NPen arteko ezberdintasunak, aldi berean egindako esperimentuetan
						  
Zelula arreen metaketa	e.e.b	200 nm HD E5 ↑ E2	e.e.b	E2: 200 nm HD ↓	E3: 1000 nm LD & HD ↓	200 nm HD (E5) ↑ 1000 nm HD (E6)
Fibrosia	e.e.b	e.e.b	e.e.b	e.e.b	E3: 1000 nm LD ↑	50 nm LD (E4) ↓ 1000 nm LD (E3)
Digestio hodian atrofia	E5-6 ↓ E1-2 & E 3-4	e.e.b	e.e.b	e.e.b	E3: 1000 nm LD ↓	50 nm LD (E4) ↑ 1000 nm LD (E3)
Digestio hodian nekrosia	e.e.b	1000 nm LD E3 ↑ E6	E1: 50 nm HD ↓	E5: 200 nm HD ↓	E3: 1000 nm LD ↑ E6: 1000 nm LD & HD ↓	50 nm LD (E4) ↓ 1000 nm LD (E3)

Egoera-indizea animalien ongizateari, egoera fisiologikoari eta hazkunderari buruzko informazioa eman dezakeen adierazlea da (Lobel & Wright, 1982). Egoera-indizea sarritan neurtzen da NPen ikerketan, plastikoen irezpenak desnutrizioa eragin dezakeelako. Kontrol muskuiluen egoera-indizea alderatzerakoan ikusi zen E3-E4 sortako muskuiluek E1-E2 eta E5-E6 sortakoek baino egoera-indize baxuagoa zutela. Kontroletan ikusitakoaren antzera, esperimentu independenteak alderatzekoan 50 nm-tako PSzko NPen tratamenduen pean mantendutako muskuiluen egoera-indizea baxuagoa izan zen bai LD zein HDra E4an E1arekin alderatuz. Berdina ikusi zen E3 eta E6 alderatzerakoan 1000 nm-tako PSzko NPetarako. Egoera hau E3-E4 aklimatazio aldian gertatutako gameto askapenarekin lotu daiteke berriro. Gametoen askapena bezalako faktore endogenoek eragina izan dezaketela muskuiluen egoera-indizean (Paul et al., 2003). 6 esperimentuetako kontrolerikiko egoera-indizean konparaketa egiterako orduan ez ziren ezberdintasunak ikusi kontrol eta NPen pean mantendutako muskuiluen artean. Antzera, tamainen artean konparaketa egitekoan ezberdintasun bakarra ikusi zen; 50 nm-tako PSzko NPen LDren pean mantendutako muskuiluen egoera-indizea 1000 nm-tako PSzko NPen LDren pean mantendutako muskuiluena baino baxuagoa izan zen.

4. Ondorioak

Esperimentuen emaitzak aztertzerakoan argi gelditzen da muskuiluen arteko berezko aldakortasunak, batez ere ziklo gametogenikoaren faseak, eragina izan dezaketela ikusten den toxikotasunean. Adibidez, hemozitoen erantzunei erreparatzen diegunean, lehengo hiru esperimentuetan toxikotasunaren eta NPen tamainaren artean badago erlazioa, muskuiluek gametoak askatu ondorengo esperimentuetan ikusten ez dena. Ehun eta organismo mailan ordea, muskuiluek gametoak askatzeak dakarren estresa jasaten dutenean NPen efektua areagotzen dela ikusten da E3 eta E4 esperimentuetan. Ikerketa honetan lortutako emaitzetan oinarrituta, ez dirudi hanturazko erreakzioak muskuiluetan NPrekiko esposizioaren biomarkatzaile gisa erabil daitezkeenik, gutxienez erabilitako kontzentrazioetan eta epe laburreko esposizio batean, beste faktore batzuek erantzun horietan eragina baitute.

3. taula: gonadaren azterketa histopatologikoan estatistikoki esangarriak diren emaitzak laburbiltzen dituen taula.
e.e.b.: ez da efekturik behatu. Partikula urdina: 50 nm; partikula berdea: 200 nm eta partikula laranja: 1000 nm.

	A.) Ezberdintasunak kontrolen artean	B.) Ezberdintasunak esperimentu independenteen artean	C.) Kontrolerik ezberdintasunak			D.) Tamaina ezberdineko NPen arteko ezberdintasunak, aldi berean egindako esperimentuetan
						  
Indize gonadala	E5-6 ↑ E3-4 (emeetan)	e.e.b	e.e.b	e.e.b	e.e.b	100 nmLHD (E3) ↑ 50 nm LD (E4)
Zelula arreen metaketa	e.e.b	100 nm HD E6 ↑ E3	e.e.b	e.e.b	e.e.b	e.e.b
Hemozitoen metaketa	e.e.b	100 nm HD E3 ↑ E6	e.e.b	E2: 200 nm HD ↓	E3: 1000 nm HD ↑	50 nm HD (E1) ↑ 200 nm HD (E2) 1000 nm HD (E3) ↑ 50 nm HD (E4)
Fibrosia	e.e.b	e.e.b	E4: 50 nm HD ↑	e.e.b	E3: 1000 nm LD & HD ↑	e.e.b
Oozitoen atresia	e.e.b	50 nm HD E5 ↑ E1	e.e.b	e.e.b	e.e.b	200 nm HD (E2) ↑ 50 nm HD (E1)
Oozitoen nekrosia	e.e.b	1000 nm HD E3 ↑ E6	e.e.b	e.e.b	e.e.b	200 nm HD (E2) ↑ 50 nm HD (E1)

5. Etorkizunerako planteatzen den norabidea

Lan asko dago egiteke itsasoan dauden NPeK organismo ezberdinetan izan ditzaketen eraginak ezagutzeko. Esperimentu ugari burutu beharko da oraindik tamaina, polimero mota eta forma ezberdineko NPen benetako arriskua ezagutu nahi baldin bada. Gainera, NP mota ezberdinek hainbat itsas organismotan sortu ditzaketen eraginak frogatzear daude. Ikerketa hau abiapuntutzat hartuta, ingurumenean topa daitezkeen NP ezberdinen nahasteak itsas muskuiluetan zein beraien gameto eta enbrioietan epe luzera sortu ditzaketen eraginak argitzea izango da gure lan taldearen hurrengo erronka.

6. Erreferentziak

- Barboza, L., Cózar, A., Gimenez, B., Lima, T., Kershaw, P., Guilhermino, L. (2019). Macroplastics pollution in the marine environment. *World Seas: an Environmental Evaluation*, 305-328 pp.
- Bignell, J., Cajaraville, M. P., Marigómez, I. (2012). Background document: histopathology of mussels (*Mytilus* spp.) for health assessment in biological effects monitoring. ICES Cooperative Report No. 315, 111-315 pp.
- Carella, F., Feist, S., Bignell, J.P., De Vico, G. (2015). Comparative pathology in bivalves: Aetiological agents and disease processes. *Journal of Invertebrate Pathology*, 131, 107-120.
- Cole, M., Artoli, Y., Coppock, R., Galli, G., Saad, R., Torres, R., Vance, T., Yunnice, A., Lindeque, P.K. (2023). Mussel power: Scoping a nature-based solution to microplastic debris. *Journal of Hazardous Materials* 453, 131392.

- Corsi, I., Bellingeri, A., Bergami, E. (2023). Progress in selecting marine bioindicators for nanoplastics ecological risk assessment. *Ecological Indicators* 154, 110836.
- Dang, F., Wang, Q., Huang, Y., Wang, Y., Xing, B. (2022). Key knowledge gaps for One Health approach to mitigate nanoplastic risks. *Eco-Environment & Health* 1, 11-22.
- De Sá, C., Oliveira, M., Ribeiro, F., Lopes Rocha, T., Norman, M. (2018). Studies of the effects of microplastics on aquatic organisms: What do we know and where should we focus our efforts in the future? *Science of The Total Environment*, 645, 1029-1039.
- Garmendia, L., Soto, M., Vicario, U., Kim, Y., Cajaraville, M.P., Marigómez, I. (2011). Application of a battery of biomarkers in mussel digestive gland to assess long-term effects of the *Prestige* oil spill in Galicia and Bay of Biscay: Tissue-level biomarkers and histopathology. *Journal of Environmental Monitoring*, 13, 915-932.
- Gonçalves, J.M., Bebianno, M.J. (2021). Nanoplastics impact on marine biota: A review. *Environmental Pollution* 273, 116426.
- Gonçalves, J.M., Benedetti, M., d'Errico, G., Regoli, F., Bebianno, M.J. 2023. Polystyrene nanoplastics in the marine mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Environmental Pollution* 333, 122104.
- Gong, H., Li, R., Li, F., Guo, X., Xu, L., Gan, L., Yan, M., Wang, J. (2023). Toxicity of nanoplastics to aquatic organisms: Genotoxicity, cytotoxicity, individual level and beyond individual level. *Journal of Hazardous Materials* 443, 130266.
- González-Soto, N., Hatfield, J., Katsumiti, A., Duroudier, N., Lacave, J.M., Bilbao, E., Orbea, A., Navarro, E., Cajaraville, M.P. (2019). Impacts of dietary exposure to different sized polystyrene microplastics alone and with sorbed benzo[a]pyrene on biomarkers and whole organism responses in mussels *Mytilus galloprovincialis*. *Science of The Total Environment* 684, 548-566.
- Hamm, T., Lenz, M. 2021. Negative impacts of realistic doses of spherical and irregular microplastics emerged late during a 42 weeks-long exposure experiment with blue mussels. *Science of the Total Environment*, 778, 146088.
- Han, Y., Lian, F., Xiao, Z., Gu, S., Cao, X., Wang, Z., Xing, B. (2022). Potential toxicity of nanoplastics to fish and aquatic invertebrates: Current understanding, mechanistic interpretation, and meta-analysis. *Journal of Hazardous Materials* 427, 127870.
- Katsumiti, A., Cajaraville, M.P. 2019. : *In Vitro* Toxicity Testing with Bivalve Mollusc and Fish Cells for the Risk Assessment of Nanoparticles in the Aquatic Environment In: *Ecotoxicology of Nanoparticles in Aquatic Systems*. J BLASCO, I CORSI (eds), Science Publishers CRC Press/ Taylor & Francis Group, Boca Raton, London, New York, pp 62-98. ISBN 9781138067264.
- Katsumiti, A., Losada-Carrillo, M.P., Barros, M., Cajaraville, M.P. (2021). Polystyrene nanoplastics and microplastics can act as trojan horse carriers of benzo(a)pyrene to mussel hemocytes *in vitro*. *Scientific Reports* 11, 1-17.
- Kim, Y., Ashton-Alcox, K., Powell, E. (2006). *Histological techniques for marine bivalve molluscs: update*. Silver Spring, MD. NOAA Technical Memorandum NOS NCCOS, 27, 76 pp.
- Kokilathasan, N., Dittrich, M. (2022). Nanoplastics: Detection and impacts in aquatic environments- A review. *Science of the Total Environment* 849, 157852.
- Li, J., Lusher, A.L., Rotchell, J.M., Deudero, S., Turra, A., Brate, I.L., Sun, C., Hossain, M.S., Li, Q., Kolandhasamy P., Shi H. (2019). Using mussel as a global bioindicator of coastal microplastics pollution. *Environmental Pollution* 522-533.
- Lobel, P.B., Wright, D.A., 1982. Relationship between body zinc concentration and allometric growth measurements in the mussel *Mytilus edulis*. *Marine Biology*. 66, 145-150.
- Lu, Z., Wu, S., Xiao, Z., Song, J., Wu, H., Peng, X. (2023). Responses of microRNA in digestive glands of mussel *Mytilus galloprovincialis* exposed to polystyrene nanoplastics. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 249, 114412.
- Martin, L.M.A., Gan, N., Wang, E., Merrill, M., Xu, W. (2022). Material, surfaces, and interfacial phenomena in nanoplastics toxicology research. *Environmental Pollution* 292, 11842.
- OECD (2022). *Global Plastics Outlook: Economic Drivers, Environmental Impacts and Policy Options*, OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/de747aef-en>.
- Paul, K.S., Lam, W.U., Rudolf, S.S. 2003. The use of bioindicators, biomarkers and analytical methods for the analysis of POPs in developing countries. *STAP Workshop. University of Hong Kong* (79 pp.).
- Plastic Europe, (2024). https://plasticseurope.org/es/wp-content/uploads/sites/4/2024/11/PE_TheFacts_24_digital-1pager.pdf
- Provenza, F., Rampih, D., Pignattelli, S., Pastorino, P., Barceló, D., Prearo, M., Specchiulli, A., Renzi, M. (2022). Mussel watch program for microplastics in the Mediterranean Sea: Identification of biomarkers of exposure using *Mytilus galloprovincialis*. *Ecological Indicators*, 142: 1-10.
- Reynaud, S., Aynard, A., Grassl, B., Gigault, J. (2022). Nanoplastics: From model materials to colloidal fate. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* 57, 101528.
- Sendra, M., Saco, A., Yeste, M.P., Romero, A., Novoa, B., Figueras, A. (2020). Nanoplastics: from tissue accumulation to cell translocation into *Mytilus galloprovincialis* hemocytes. Resilience of immune cells exposed to nanoplastics and nanoplastics plus *Vibrio splendidus* combination. *Journal of Hazardous Materials* 388, 121788.
- Seuront, L., Zardi, G.I., Uguen, M., Bouchet, V.M.O., Delaeter, C., Henry, S., Spilmont, N., Nicastró, K.R. (2022). A whale of plastic tale: a plea for interdisciplinary studies to tackle micro and nanoplastic pollution in the marine realm. *Science of the Total Environment* 846, 157187.
- Villalba, A., Mourelle, S., Carballal, M., López, C. (1997). Symbionts and diseases of farmed mussels *Mytilus galloprovincialis* throughout the culture process in the Rías of Galicia (NW Spain). *Diseases of Aquatic Organisms*, 31, 127-139.
- Wang, S., Hu, M., Zheng, J., Huang, W., Shang, Y., Kar-Hei Fang, J., Shi, H., Wang, Y. (2021). Ingestion of nano/micro plastic particles by the mussel *Mytilus coruscus* is size dependent. *Chemosphere* 263, 127957.
- Ziani, K., Ionita-Mindrican, C.B., Mititelu, M., Neacsu, S.M., Negrei, C., Morosan, E., Drăgănescu, D., Preda, O.T. (2023). Microplastics: A real global threat for environment and food safety: A state of the art review. *Nutrients* 15, 617.

7. Eskerrak eta oharrak

- Ikerketa hau, Europako Batzordearen Joint Research Center delakoak (CAS - Centre of Advanced Studies 6, titled "NANOPLASTICS - Towards a technological platform for nanoplastics detection", ref. CAS 30602, DG JRC, S.4 Unit), Espainiako Zientzia eta Berrikuntza Ministerioak (FIERA proiektua, ref. PID2021-128600OB-I00, MCIN/AEI/ 10.13039/501100011033 and "ERDF A way of making Europe), Eusko Jaurlaritzak (N. Gonzalez-Sotoren doktoretza ondoko kontratua eta IT1743-22 ikerketa talde finantziaren bitartez) eta LTC AquEus mugaz gaindiko lankidetzarako laborategiak (Euskampus Fundazioa eta Eusko Jaurlaritzak) finantzatu dute.
- Egileok esker onak adierazi nahi dizkiogu Angulas Aguinaga S.AU. enpresari esperimintuetan erabilitako muskuiluak emateagatik.