



IKER  
GAZTE  
NAZIOARTEKO  
IKERKETA EUSKARAZ

# I. IKERGAZTE

NAZIOARTEKO IKERKETA EUSKARAZ

2015eko maiatzaren 13, 14 eta 15  
Durango, Euskal Herria

ANTOLATZAILEA:  
Udako Euskal Unibertsitatea (UEU)

## ZIENTZIA ZEHATZAK ETA NATUR ZIENTZIAK

**Biomonitorizazio teknika berrien  
garapena ingurugiroko kutsatzaile  
organikoen biokontzentrazioa  
determinatzeko**

*O. Ros, O. Posada, A. Delgado,  
A. Vallejo, M. Olivares, A. Prieto  
eta N. Etxebarria*

389-394 or.

<https://dx.doi.org/10.26876/ikergazte.i.53>

ANTOLATZAILEA:



BABESLEAK:



LAGUNTZAILEAK:



## **Biomonitorizazio teknika berrien garapena ingurugiroko kutsatzaile organikoen biokontzentrazioa determinatzeko**

Ros O., Posada O., Delgado A., Vallejo A., Olivares M., Prieto A. eta Etxebarria N.

*Kimika Analitikoa Saila, Zientzia eta Teknologia Fakultatea, Euskal Herriko Unibertsitatea (EHU/UPV). 644 posta kutxatila, 48080 Bilbo, Bizkaia.  
oihana.ros@ehu.eus*

### **Laburpena**

*Euskal Herriko estuarioetan bizi diren arrainak kutsatzaileen koktel handi batera esposatuak daude egunero. Kutsatzaile hauek aldaketak eragiten dituzte sistema endokrinoan, arrainen tamaina txikituz edo malformazioak eta intersexualitatea sortaraziz, adibidez. Aldaketa hauek kutsatzailearekin eta bere kontzentrazioarekin erlazionatua dagoenez, kutsatzaileen kontzentrazio maila ezagutzea beharrezkoa da. Lan honetan, aldaketa hormonalak eragiten dituzten hainbat konposatu (pestizidak, bisfenol-A, hormonak, musk fragantziak, ftalatoak eta alkil fenolak) aztertu dira ur laginetan (estuario eta araztegiko irteera) zein lazunen (*Chelon labrosus*) bilisean. Oro har, kutsatzaileak lazunen bilisean, ur laginetan baino 1000 aldiz kontzentrazio handiagoan aurkitu dira.*

*Hitz gakoak: lazunak, arrain bilisa, biokontzentrazioa, konposatu organikoak, estuarioak, araztegiko irteera korrontea*

### **Abstract**

*The fish inhabiting the Basque estuaries are everyday exposed to a chemical cocktail. As a consequence, the fish suffer from some endocrine alterations dealing to a size decreasing, malformations or intersexuality, for instance. These changes are related with the contaminant concentration, thus it is very important to know the level of the contaminants. In this work, different compounds causing endocrine disruption (pesticides, bisphenol-A, hormones, musk fragrances, phthalates and alkyl phenols) are measured in water samples (estuary and effluent waste water) and in mullet's (*Chelon labrosus*) bile. In general, the pollutants in mullet's bile were 1000 higher than the ones reported in water samples.*

*Keywords: mullets, fish bile, bioconcentration, organic compounds, estuaries, wastewater treatment plant effluent*

### **1. Sarrera eta motibazioa**

Kutsatzaile kimikoek eta naturalek ekosisteman zein gizakiaren osasunean duten efektuen eta eraginaren azterketa, arlo desberdinetako ikerketa talde askoren helburu nagusi bilakatu da azkenaldi honetan. Gaur egun, ingurumenaren ebaluazioa egiteko, tresna eta metodologia estandarrik ez dagoenez (bateratutako erreferentziak, kutsatzaileen eragina aztertzeke balioztatutako prozedurak...), esfortzu handia egin behar da guztiontzat baliagarriak diren metodologia estandarrik garatzeko. Horretarako, egin beharreko urratsetako bat biomonitorizazio estrategia egoki eta sendoen garapena da.

Zentzu honetan, Europar Batasunean (EB) ur ingurumenaz arduratzen den legedi nagusia Uraren Marko Direktiba (*Water Frame Directive*, WFD) da. Legedia honek, kutsatzaileak bi talde nagusitan sailkatzen ditu, lehentasunezkoak eta emergenteak. Lehentasunezkoak, urteetan zehar erabili izan diren eta ingurugiroan kalte esanguratsua eragiten duten konposatuak dira. Horrez gain, hauek aztertzeke erabili beharreko metodoak ezagunak dira. Hala ere, azken hamarkadan kutsatzaile berriak gehitu dira zerrenda honetara, ftalatoak, nonilfenolak, bisfenol-A (BPA) eta estrogeno sintetikoak adibidez eta konposatu hauentzat ez dago metodologia estandarrik finkatuta. Bigarren taldean, aldiz, kutsatzaile emergenteak zerrendatzen dira. Talde honetan farmazeutikoak, zaintza pertsonaleko produktuak edo ultramore iragazkiak aurkitzen dira besteak beste. Hauen eragina ingurugiroan, eta bizidunentzat oso argi ez dagoen arren, kalteak eragiten dituztelako susmoa dago (Jeannot, 2002; Fent et al., 2006; Bergman, 2013). Hala ere, gaur egun arte ez dira legedi hauen biomonitorizazio programan sartu.

Kutsatzaile hauen iturririk garrantzitsuena araztegiatiko irteera korronteak dira (Ellis et al., 2006; Miege et al., 2009; Bizkarguenaga et al., 2012; Ros et al., 2015). Berez, araztegiak ez daude prestatuta kutsatzaile hauek arazteko, eta konposatuak irteerako korrontetik kaleratzen dituzte etengabe. Nahiz eta kaleratzen diren kontzentrazio mailak baxuak izan (ng/L maila), etengabeko kaleratzea denez, nahikoa da ingurumenean efektu toxikoak sortzeko, animalietan metatzeko eta sistema endokrinoan aldaketak eragiteko (Madsen et al., 2004; Martínez-Gómez et al., 2013; Bizarro et al., 2014). Malformazioak, tamainaren txikitzea, populazioaren murrizketa eta intersexualitatea dira kutsatzaile maila hauen ondorioetako batzuk (Madsen et al., 2004; Martínez-Gómez et al., 2013; Bizarro et al., 2014). Aldaketa guzti hauek, sistema endokrinoaren berezko prozesuan gertatzen diren aldaketen ondorioa dira. Konposatu hauei disruptore endokrino (*Endocrine Disrupting Compound*, EDC) deritze. 500 konposatu baino gehiago proposatu dira<sup>1</sup> EDC moduan sailkatzeko. Hauen artean alkil fenolak (AP), dioxinak, pestizidak, plastikoen osagaiak, hormona natural zein sintetikoak, hidrokarbuo polizikliko aromatikoak eta zaintza pertsonaleko produktuak aurki ditzakegu. Konposatu hauek, ziklo endokrinoa kontrolatzen duten hormonak imitatzen diren sistema funtzionamendua aldaraziz. Intersexualitatea da arazo aipagarrienetako bat, non arrain hauek ar eta emeen ezaugarriak erakusten dituzten aldi berean (Bizarro et al., 2014). Mundu mailan arrain espezie desberdinetan aurkitu da fenomeno hau (De metrio et al., 2003; Martinez-Gomez et al., 2013) baita Euskal Herrian (EH) ere, Urdaibaiko biosferan (Gernikako araztegi aurrean), Pasaia eta Debako portuetan adibidez (Puy-Azurmendi et al., 2013; Bizarro et al., 2014; Sardi et al., 2015). Gainera, aipatzekoa da, kutsatzaile hauek arrainetan metabolizatzen direla eta eratzen diren metabolitoek ere efektu berdinak sortzen dituztela. Ondorioz, kutsatzaileak aztertzeaz gain, beren metabolitoak ere aztertu behar dira.

## 2. Arloko egoera eta ikerketaren helburuak

Aurretiaz aipatu diren arazoei aurre egiteko eta EH-ko egoera ezagutzeko helburu nagusi hau planteatu da:

EDC desberdinak biomonitorizatzeko metodo analitiko berriak garatzea bai arrainetan bai uretan.

Helburu nagusi hau lortzeko 6 izan dira ikerketan zehar aztertutako EDC familiak: ftalatoak (bis-2-etilhexil ftalatoa (DEHP), di-*n*-oktil ftalatoa (DOP) eta *n*-butil-benzil ftalatoa (BBP) eta hauen metabolitoak (mono-2-etilhexil esterra (MEHP), mono-*n*-oktil esterra (MOP) eta mono benzil esterra (MBzP)), pestizidak ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ -hexakloro ziklohexano isomeroak ( $\alpha$ -HCH,  $\beta$ -HCH,  $\gamma$ -HCH,  $\delta$ -HCH), klorfirifos, klorfenbinfos, 2,4-bis(p-klorofenil) etano (2,4-DDD), 4,4-bis(p-klorofenil) etano (4,4-DDD), 1-kloro-2-[2,2,2-trikloro-1-(4-klorofenil)etil] (2,4'-DDT) eta 1,1'-(2,2,2-trikloroetilideno) bis[4-kloro] (4,4-DDT)), eta bi metabolito ( $\alpha$ -2,4'-trikloro azetofenona (TCA) eta 3,5,6-trikloro-2-piridinol (TCP)) musk fragantziak (galaxolide (HHCB) eta tonalide (AHTN)), AP (4-*tert*-oktil fenola (4*t*OP), 4-*n*-oktil fenola (4*n*OP) eta nonil fenol nahaste isomerikoa (NP<sub>mix</sub>)), hormona natural zein sintetikoak (17  $\beta$ -estradiola (E2) eta 17  $\alpha$ -etinilestradiola (EE2)) eta BPA.

Orain arte garatu izan diren metodoak ez dira gaur ezagutzen ditugun konposatu guztiak neurtzeko gai. Hori dela eta, metodo berri hauek konposatu askoren aldibereko determinazioa ahalbidetu behar dute traza mailan. Gainera, konposatu hauen ezaugarri fisiko-kimikoei esker, arrainen atal desberdinetan metatzeko joera dute (Martinez-Gomez et al., 2013); ondorioz, metodo analitikoak uretan garatzeaz gain arrainen bilisean, plasman eta muskuluan ere garatu behar dira bai analitoentzat baita beraien metabolitoentzat ere. Aztertuko den matrizearen arabera, erauzketa metodo desberdinak erabiliko dira. Matrize likidoentzat fase solido erauzketa (*solid phase extraction*, SPE) eta polimero desberdinetako zuntzen bidezko mikroerauzketa erabiltzen diren bitartean, matrize solidoetarako ultrasoinu fokatuaren bidezko erauzketa (*Focused Ultrasound Solid-Liquid extraction*, FUSLE) erabiliko da.

Azkenik, garatutako metodologia guztiak bateratuko dira, kontrolpeko esperimendu batean, aukeratutako kutsatzaileek arrainetan daukaten biokontzentrazioa determinatzeko.

### 3. Ikerketaren muina

Ikerketa lan honetan, 3 izan dira garatu diren lanik aipagarrienak.

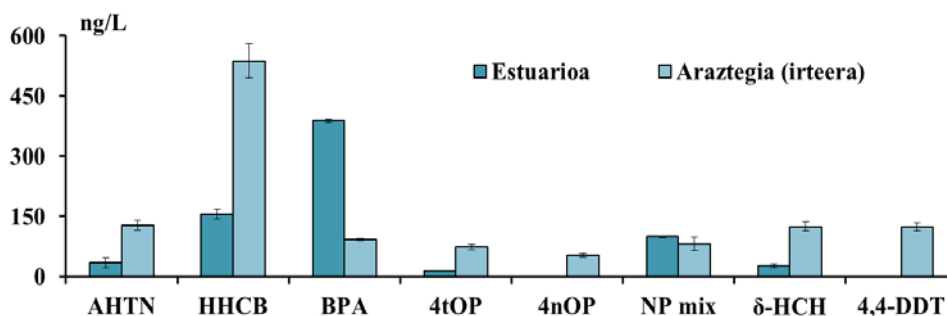
#### 3.1 Ur laginen analisia egiteko metodoaren garapena

Ur laginen analisia burutzeko, mikroerauzketan oinarritutako metodo berri bat optimizatu da polietersulfona (*polyethersulfone*, PES) polimeroa erabiliz. Laburki azalduta, jasotako 150 mL ur laginei % 10 gatza gehitu zaie eta 7.5 cm luzera duen PES zuntz bat sartu da erauzketa burutzeko. Laginak gau osoan irabiatzen egon ostean etil azetatoa (EtOAC) erabiliz analitoak zuntzetik erauzi eta gas-kromatografia-masa-espektrometria (GC-MS) bidez neurtu dira.

Metodo hau Galindo araztegiko irteera urei eta Nerbioi-Ibaizabal estuarioko urei aplikatu zaie. 1.irudian ikus daitekeen moduan, bai estuario bai araztegiko irteerako uretan 2 musk fragantzia, BPA, 3 AP eta bi pestizida detektatzen dira ng/L mailan. Araztegiko uretan HHCB fragantzia detektatzen da kontzentrazio altuenean. Estuarioan, aldiz, BPA da kontzentrazio altueneko konposatua.

Araztegietako uretan konposatu gehiago antzematen dira eta kontzentrazio altuagoetan daude BPA-ren kasuan izan ezik. Galindoko araztegiak Bilbo handiko etxeko urak eta ur industrialak jasotzen ditu (350000 m<sup>3</sup>/egunean); beraz, ulertzekoa da araztegietako urak estuariokoak baino kutsatuagoak egotea. Emaitza hauek lan taldearen beste ikerketa batzuekin bat datoz, non teknika desberdinak erabiliz araztegietako irteera eta estuarioko urak aztertu diren (Blanco-Zubiaguirre et al., 2013; Delgado et al., 2013; Ros et al., 2015).

#### 1. irudia. Araztegi eta estuarioetako laginetan aurkitutako konposatuak ng/L mailan.



#### 3.2 Bilis laginen azterketa egiteko metodo analitikoaren optimizazioa

Bilis laginak aztertzeko bi metodo desberdin garatu dira.

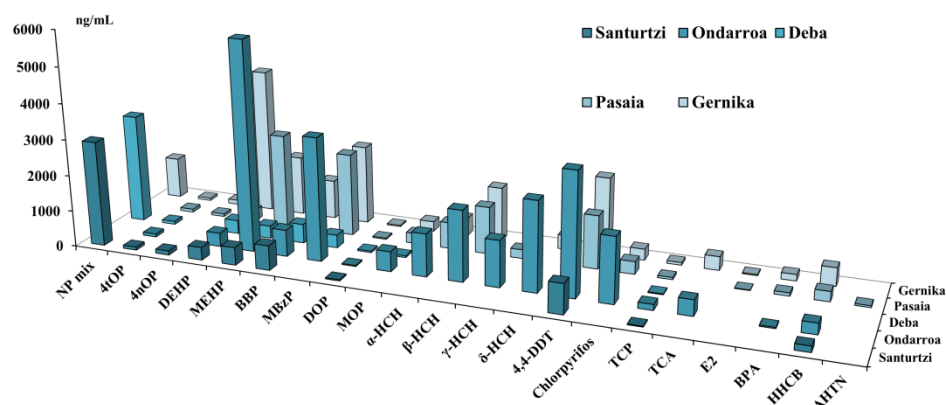
Lehenengoan Euskal Herriko kostaldeko 5 puntu desberdinetako (Urdaibaiko estuarioa eta Deba, Pasaia, Ondarroa eta Santurtziko portuak) lazunak aztertu ziren. Lan hau Euskal Herriko Unibertsitateko (EHU) Zoologia eta Biologia molekularreko lankideekin batera burutu zen kutsatzaileek arrainetan izan ditzaketen ondorioak kuantifikatzeko, intersexualitatea adibidez. Erauzketa burutu aurretik, hidrolisi entzimatik urrats bat burutu behar da metabolizatutako konposatuak aske uzteko. Ostean, erauzketa prozesu bat egiten da SPE bidez. Hidrolizatutako 100 µL bilis Plexa SPE kartutxoetatik (estireno-dibinilbenzeno hidrofilikoa, 200-mg) pasaratzen dira eta kutsatzaileak 4 mL EtOAC-kin berreskuratzen dira. Berreskuratutako EtOAC-n interferentzia gehiegi erauzten direnez, SPE bidezko garbiketa pauso bat egin behar da Florisil erabiliz. Garbiketa honetan ere, ezaugarri fisiko-kimiko desberdinak dituzten analitoak bereizten dira. Lehenengo taldean AP, pestizidak, musk fragantziak eta ftalatoak daude eta bigarren taldean, pestizida eta ftalato metabolitoak, hormonak eta BPA. Lehenengo taldeko konposatuak zuzenean GC-MS bidez neurtzen dira eta bigarren taldekoak GC-MS bidezko analisia baino lehen deribatizatu egin behar dira.

2 irudian, aztertutako 5 puntuetan lortutako emaitzak ikus daitezke. Bertan, analitoak ng/mL-ng/µL mailan (arrain guztietan dagoen kontzentrazioaren batez bestekoa dago irudikaturik) aurkitzen dira. Lagin puntu guztietan aztertutako familietatik konposatu bat detektatzeko gai izan gara. Ondarroa eta Gernika dira kutsadura maila handiena erakusten duten tokiak; hala ere, arrainik kutsatuena Gernikako

araztegiaren irteeran aurkitu da. Uren kontzentrazioei erreparatzen badiegu, Gernika izan da kutsadura mailarik handiena erakutsi duen gunea.

Gernikako puntuaz gain, Pasaia eta Debako puntuetan ere intersex arrainak aurkitu dira, nahiz eta Gernikan baino kopuru txikiagoan izan. Metodo honekin frogatuta geratu da konposatuak bilisean metatzeko duten joera eta uretan detektatu ezin diren hainbat konposatu ikusteko gai garela

## 2. irudia. Euskal kostaldeko puntu desberdinetan jasotako arrainen bilisaren kontzentrazioa ng/mL.



Bigarren metodologian, aldiz, bilisa aztertzeko PES bidezko mikroerauzketa erabiltzen da AP, hormonak, BPA eta ftalato metabolito bat aztertzeko.

Lan honetan, analitoak likido-kromatografia-tandem masa-espektrometria (LC-MS/MS) analizatu dira eta hidrolisia eta erauzketa aldi berean egin dira, prozesua 15h-tik 3h-ra murriztuz. Laburki, hidrolizatu gabeko 100 µL bilis 7.5 cm PES zuntzekin (5 zatitan banatuta) eta hidrolisia burutzeko behar den entzimarekin (200 µL β-glukuronidasa) nahasten dira. Lagina 3 orduz irabiatzen da 37 °C-an eta ondoren, analitoak metanola (MeOH) erabiliz berreskuratzen dira LC-MS/MS analisiaren aurretik. Metodologia berri honekin ia 9 ordu aurreratzeaz gain 15 lagin batera aztertu daitezke prozesua asko erraztuz. Metodo hau Galindo ibaian hartutako bilisetan erabili da eta MEHP eta BPA izan dira aurkitutako konposatuak ng/mL mailan.

### 3.4 Biokontzentrazio mailak

Aurretik garaturiko bi metodologiak lan batean elkartu dira, lazunek duten biokontzentrazio maila determinatzeko. Esperimentu hau, EHUK duen Plentziako Itsas Estazioan (PIE) burutu zen, Gernikako eta Galindoko araztegi-tako irteerako urak erabiliz. Ur hauek, itsasoko urarekin nahastu dira %25, %50 eta %75 mailan eta ontzi bakoitzean heldugabeko 20 lazun sartu dira. Ura bi egunean behin aldatu da eta aldaketa aurretik eta aldaketa ostean kutsatzaileen balioak neurtu dira. Oro har, aipatu behar da esperimenduak iraun bitartean uren kontzentrazioa nahiko egonkor mantendu dela, ng/L mailan analito guztientzat, HHCB, BPA eta ftalatoentzat izan ezik (ng/mL maila). Bilis laginei dagokienez, esperimenduko 3. egunean 10 arrain jaso dira eta gainontzeko guztiak esperimendu amaieran, 10. egunean.

Bilisean analitorik gehienak ng/mL mailan aurkitzen dira eta NP<sub>mix</sub>, BPA eta ftalatoak izan ezik (ng/µL mailan). Uretan detekzio muga azpitik dauden hormonak adibidez bilisean aurkitu dira, baina pestizidarik ez da atzeman. Bilisaren erabilerarekin frogatu daiteke, kimika analitikoaren ikuspegitik oraindik detekta ezin diren hainbat analito ingurumeneko uretan aurkitzen direla, nahiz eta oso maila baxuan izan. Horrez gain, aipatzekoa da bilisean ikusitako kontzentrazioak ez direla uraren diluzioarekin aldatzen, ezta esosatze egunekin ere. Arrainen poltsa biliarra etengabe husten dute; beraz, pentsatzekoa da konposatu hauek eguneroko menpekotasunik ez dutela.

1. taulan Galindoko arraintzat lorturiko biokontzentrazio faktoreak (BKF=Analitoen kontzentrazioa bilisean/Analitoen kontzentrazioa uretan) laburbiltzen dira. Kasurik gehienetan biokontzentrazio maila diluzio mailarekin jaisten da musk fragantzien salbuespenarekin. Azken kasu honetan, bilisean lortzen den kontzentrazioa diluzio mailaren menpekoa da, hau diluzio faktorea baino handiagoa izanik. Hori dela eta, BKF-n hazkuntza bat ikusten da. Azkenik, aipatu beharra dago, zenbait kasutan lorturiko BKF balioak handiak direla eta Kanadako gobernuak 1995. urtean proposatu zuen moduan (Kanadako gobernuak, 1995) BKF 5000 baino handiagoa denean, biokontzentrazioa dagoela aipa daiteke; beraz, bilisak analitoak metatzeko duen ahalmena baieztaturik geratzen da.

**1. taula. Galindoko araztegiko urak erabiliz lazunentzat lortu diren biokontzentrazio mailak bilisean.**

	3. eguna			10. eguna		
	25% Diluzioa	50% Diluzioa	75% Diluzioa	25% Diluzioa	50% Diluzioa	75% Diluzioa
HHCB	414	661	1135	1565	1373	1372
AHTN	<detekzio muga	5966	19360	6860	10696	11219
BBP	7625	5728	7773	36355	6383	18086
DEHP	7900	4229	8113	17564	3127	6122
4nOP	16637	9755	7743	25315	13108	12522
NP <sub>mix</sub>	363467	171150	114012	475572	200829	171834
4nOP	39389	19674	26020	74193	388577	87473
BPA	19519	7097	2276	3678	1392	1985
E2	199653	149311	225874	639207	388577	87473
EE2	33872	35413	33836	67018	57074	15852

**4. Ondorioak**

Ikerketa lan honen bitartez, EDC-ak analizatzeko metodo berriak, azkarrak eta errepikakorrek garatu dira. Ondorioz, EDC-ak ingurugiroko ur desberdinetan detektatu ditugu. Horrez gain, lazunen bilisa erabiliz kimika analitikoaren ikuspegitik detekta ezinak diren zenbait konposatu ikusi ditugu, bilisak duen metatze-ahalmena baieztatuz. Bestaldekik, euskal kostaldean intersexualitatea erakusten duten arrainak aurkitu dira, eta hauek kontzentrazio mailarekin lotuta dagoelako susmoa areagotu egin da. Hala ere, oraindik lan handia geratzen da egiteko.

**5. Etorkizunerako planteatzen den norabidea**

Ikerketa lan honetan egin den lana hasiera baino ez da, beraz etorkizunari begira konposatu gehiago eta maila baxuagoan neurtzeko metodo berriak garatu beharko lirateke. Halaber, bilisaz gain plasma eta arrain muskuluan konposatuak neurtzeko metodoak garatu behar dira, baita arrain espezie desberdinak aztertu ere. Metodologia guztia prest dagoenean, euskal kostaldeko egoera monitorizatzea izango litzateke azken urratsa, honek duen egoera zein den ikusteko.

**6. Erreferentziak**

Bergman, Å. (2013): State of the science of endocrine disrupting chemicals - 2012, World Health Organization, U.N.E.P. (Ed.). An assessment of the state of the science of endocrine disruptors prepared by a group of experts for the United Nations Environment Programme (UNEP) and WHO.

Bizarro, C. (2014): Intersex condition and molecular markers of endocrine disruption in relation with burdens of emerging pollutants in thicklip grey mullets (*Chelon labrosus*) from Basque estuaries (South-East Bay of Biscay), *Marine environmental research*, 96, 19-28.

Bizkarguenaga, E. (2012): Solid-phase extraction combined with large volume injection-programmable temperature vaporization-gas chromatography-mass spectrometry for the multiresidue determination of priority and emerging organic pollutants in wastewater, *Journal of chromatography A*, 1247, 104-117.

- Blanco-Zubiaguirre, L. (2013): Assessment of commercially available polymeric materials for sorptive microextraction of priority and emerging nonpolar organic pollutants in environmental water samples, *Environmental science and pollution research*, 121 (20), 11867-11883.
- Delgado, S. (2013): Silicone rod extraction followed by liquid desorption-large volume injection-programmable temperature vaporiser-gas chromatography-mass spectrometry for trace analysis of priority organic pollutants in environmental water samples, *Talanta*, 117, 471-482.
- De Metro, G. (2003): Evidence of a high percentage of intersex in the Mediterranean swordfish (*Xiphias gladius* L.), *Marine pollution bulletin*, 46, 358-361
- Ellis, J.B. (2006): Pharmaceutical and personal care products (PPCPs) in urban receiving waters, *Environmental pollution*, 144, 184-189.
- Fent, K. (2006): Ecotoxicology of human pharmaceuticals, *Aquatic toxicology*, 76, 122-159.
- Hao, C. (2007): GC-MS and HPLC-MS analysis of bioactive pharmaceuticals and personal-care products in environmental matrices, *Trends in analytical chemistry*, 26, 569-580.
- Jeannot, R. (2002): Determination of endocrine-disrupting compounds in environmental samples using gas and liquid chromatography with mass spectrometry, *Journal of chromatography A*, 974, 143-159.
- Kanadako gobernua (1995): Toxic Substances management policy-persistence and bioaccumulation criteria. Kanadako gobernua, Ottawa, Ontario, Kanada. ISBN 0-662-61860-2.
- Madsen, S. (2004): 17- $\beta$  Estradiol and 4-nonylphenol delay smolt development and downstream migration in Atlantic salmon, *Salmo salar*, *Aquatic toxicology*, 68, 109-120.
- Martinez-Gomez, C. (2013): Integrated chemical and biological analysis to explain estrogenic potency in bile extracts of red mullet (*Mullus barbatus*), *Aquatic toxicology*, 134-135, 1-10.
- Miege, C. (2009): Fate of pharmaceuticals and personal care products in wastewater treatment plants – Conception of a database and first results, *Environmental pollution*, 157, 1721-1726.
- Puy-Azurmendi, E. (2013): Endocrine disruption in thicklip grey mullet (*Chelon labrosus*) from the Urdaibai Biosphere Reserve (Bay of Biscay, Southwestern Europe), *Science of total environment*, 433, 233-244.
- Ros, O. (2015): Microextraction with polyethersulfone for bisphenol-A, alkylphenols and hormones determination in water samples by means of gas chromatography–mass spectrometry and liquid chromatography–tandem mass spectrometry analysis, *Talanta*, 134, 247-255.
- Sardi, A. (2015): Steroidogenesis and phase II conjugation during the gametogenesis of thicklip grey mullets (*Chelon labrosus*) from a population showing intersex condition, *General and comparative endocrinology*, DOI: 10:1016/j.ygcen.2015.01.005

## 7. Eskerrak eta oharrak

- Lan hau Espainiako ekonomia eta lehiakortasun ministerioak (CTM-2010-21599) eta ORQUE SUDOE proiektuak (SOE3/P2/F591/5) diruz lagundu dute eta tesia burutzeko beka EHU-ko euskara errektoreordetzak eman du. Biologia eta zoologia molekularra saileko kideak eskertu nahi ditugu arrainen inguruan eman diguten laguntzagatik.