



IKER
GAZTE
NAZIOARTEKO
IKERKETA EUSKARAZ

IV. IKERGAZTE NAZIOARTEKO IKERKETA EUSKARAZ

2021eko ekainaren 9, 10 eta 11a
Gasteiz, Euskal Herria

ANTOLATZAILEA:
Udako Euskal Unibertsitatea (UEU)

ZIENTZIAK ETA NATURA ZIENTZIAK

Litioaren toxikotasuna muskuiluetan

*Nadezhna Fraga Jesús, Urtzi
Izagirre Aramayona eta
Pamela Ruiz Rodriguez*

189-195 or.

<https://dx.doi.org/10.26876/ikergazte.iv.05.25>

ANTOLATZAILEA:



LAGUNTZAILEAK:



Litioaren toxikotasuna muskuiluetan

Fraga, N.^{1,2}; Izagirre, U.^{1,2} eta Ruiz, P.²

¹*Itsas Biologia eta Bioteknologia Esperimentalen Ikerketa Zentroa; Plentziako Itsas Estazioa, PiE-UPV/EHU.*

²*Zoologia eta Animalia Zelulen Biologia Saila, Zientzia eta Teknologia Fakultatea, UPV/EHU*
nadezhnafraga@gmail.com

Laburpena

Prozesu eta gailu industrial askotan litioaren erabileraren hedatzeak ingurumenean eragin lezake hurrengo urteetan. Hala ere, informazio gutxi dago litioak itsas organismoetan duen toxikotasunari buruz. Beraz, ikerketa honen helburua litioaren toxikotasuna eta alterazio histologikoak zehaztea da, *Mytilus galloprovincialis* muskuilua ekosistemaren osasuna ebaluatzeko behatzaile gisa erabiliz. Horretarako, toxikotasun akutuko testa eta test subletalak burutu ziren. Emaitzek erakutsi zuten LC50-ren balioa ingurumenean aurkitutako kontzentrazioak baino handiagoa zela, baina, era berean, litioak alterazio histopatologikoak eragin ditzakeela kontzentrazio txikiagoetan. Ikerketa honen aurkikuntzek ikuspegi berriak irekitzen dituzte litioak itsas organismoetan dituen ondorio toxikoak ulertzeko.

Hitz gakoak: Litioa, *Mytilus galloprovincialis*, toxikotasuna, kontzentrazio hilgarria

Abstract

*The increased use of lithium in lots of industrial processes and devices could produce an environmental impact on aquatic environment in coming ages. However, there is only scarce information concerning the toxicity of lithium in marine organisms. Therefore, the aim of this research is to determine the toxicity and histological alterations of lithium, using the mussel *Mytilus galloprovincialis* as a model organism for ecosystem health assessment. For this purpose, an acute and a sublethal toxicity tests were headed. Results showed that the LC50 value was higher than concentrations found in ambient waters, but also showed that lithium induces histopathological alterations in lower concentrations. The findings of this research open new perspectives for the understanding of the toxic effects of lithium on marine organisms.*

Keywords: Lithium, Mytilus galloprovincialis, toxicity, lethal concentration

1. Sarrera eta motibazioa

Garraio berriek (ibilgailu elektrikoek, bizikleta elektrikoek, dronek...), konektibitate-aplikazioek (*smartphone*, tabletek, *laptop*-ek, etxe-tresna elektriko txikiak...) eta energia biltegitzeko sistema berriek baterien erabilera handitzea dakarte (Comission 2006/66/EC). Beraz, azken hamarkadan litio-ioizko bateriak biltegitze-teknologia nagusia bilakatu dira. Litioak (Li) energia kimikoa energia elektriko bihurtzen du oso modu eraginkorrean, kostuak murriztuz eta fabrikazio-ahalmenak handituz (IEA, 2017). Modu honetan, litio-eskaera izugarri handitu da, eta elementu hori lortzeak ingurumenean inpaktu nabarmena izan dezake. Era berean, nahiz eta litiozko baterien erabilera asko emendatu den, haien birziklatze-tasa momentuz oso txikia da (Comission 2006/66/EC; Swarnakar & Choubey, 2014; Zeng et al., 2014). Kasu gehienetan, "beste bateria" gisa sailkatzen dira, gainera Europako Parlamentuak ez ditu bilketa-helburu sendoak edo betebeharrak ezartzen litio-baterien barruan dauden produktu kimikoen berreskuratzea sustatzeko, eta beraz udal-hondakin solidoak dituzten zabortegetan amaitzen dira (Comission 2006/66/EC; Zeng et al., 2014).

Zoritxarrez, bateria horietako elementu kimikoek (Co, Ni, ...) efektu ugari eragin ditzakete ingurumenean eta gizakian (Moore, 1995; Aral & Vecchio-Sadus, 2008; 2011). Hala ere, ez daude hain argi litioak ingurumenean eta ondorioz gizakietan sor ditzakeen efektuak. Izan ere, litio-aluminiozko hidruoak eta litio metanolatoa Danimarkako substantzia arriskutsuen zerrendan aurki daitezke (Kjølholt et al., 2003) baina, egin diren ikerketa urriak kezka sortzen dituzte (Lebedeva & Brett, 2016). Beraz, metal horrek hainbat organismotan sortzen duen toxikotasuna ebaluatzea oso garrantzitsua da, espozizio dosi eta denbora tarte desberdinak kontuan hartuz.

Biogeokimikoki, litioa oso elementu mugikorra da. Horren ondorioz, distantzia luzeak egin ditzake, ur-inguru desberdinen litio-maila handituz. Gainera, ingurumen-inpaktua areagotu egin daiteke meatzeen aktibitateak jasaten duten lekuetan. Litio pururik ez dago naturan, fosfato, silikato edo mika bezalako gatzetan agertu ohi da (Aral & Vecchio-Sadus, 2008; 2011). Gatz horietako litioa, erosioaren ondorioz, lurzoruetara iristen da, eta han landareek xurgatzen dute (Lenntech, 2007). Landareek elika-katean maila garrantzitsua direnez, animaliak eta gizakiak ere litioaren eraginpean egon daitezke horietaz elikatuz gero (Kabata-Pendias & Mukerjee, 2007).

Lurzoruetako litioaren balio ertainak 3 - 350 mg/kg bitartekoak dira (Aral & Vecchio-Sadus, 2008). Ingurune urtarretan ere badago, batez ere forma ionikoan. Bibliografiaren arabera, ur gezatan Li-ren kontzentrazioa 0,001 - 0,01 mg/L artekoa da, eta itsasoko uretan 0,17 - 0,19 mg/L artekoa (Reimann & Caritat, 2012). Lurpeko uraren kontzentrazioa, berriz, 0,5 mg/L izan da (Aral & Vecchio-Sadus, 2008). Hala ere, orain arte informazio gutxi dago itsas inguruneke litioaren kontzentrazioari buruz, eta are gutxiago horrek eragin litekeen efektuei buruz.

Alde batetik, litioaren erabilera industrialak ingurumena kutsatzen laguntzen du (Aral & Vecchio-Sadus, 2008; 2011). Baterietan erabiltzen den litioa meatzaritza-prozesuen bidez lortzen da. Jarduera horiek lotura estua dute ingurumenaren inpaktu negatiboekin, lekuaren eta aplikatutako teknologiaren arabera. Izan ere, litioaren erauzketaren ondorioz, errekak substantzia arriskutsuekin kutsatzen dira (Comission 2006/66/EC), eta substantzia hauek organismoetan eragin dezakete.

Bestalde, litioa bizitzarako funtsezko elementua ez den arren eta erabilera biologiko ezagunik ez duen arren (Lenntech, 2007), ezaugarri interesgarriak ditu (Nielsen, 1988). Hau dela eta, terapeutikoki erabiltzen da gaixotasun psikiatrikoak tratatzeko, hala nola depresio maniakoa (bipolaritatea) eta bestelako gaitz afektiboak (Moore, 1995). Nerbio-sistema zentrala da itu-organo nagusia, baina metabolismoan eta zelulen proliferazioan ere eragiten du gizakietan, baita beste organismo askotan ere (Kjølholt et al., 2003; Aral & Vecchio-Sadus, 2008). Gaur egun, litioa gaixotasun horiek tratatzeko erabiltzen da baina toxikotasunaren eta dosifikazio eraginkorraren arteko leihoterapeutikoa oso estua da. Malgor-ek (2016) efektu terapeutikorik onenak odolean 0.7 - 1.4 mg/L bitarteko litio kontzentrazioak lortzen direnean ematen direla azaltzen du. Aldiz, toxikotasunaren ondorioak erraz garatzen dira litemiaren balioak 2.0 mg/L-koak direnean, hilkortasuna 2.5 mg/L-ko balioa gaingaitzen denean eman daitekeelarik.

Laburbilduz, litioaren erabilera handitu egin dela nabaria da, eta metal honi buruzko kezkek areagotuz doaz denbora pasa ahala. Erabilera horrek eragin nabarmena izan dezake ingurumenean eta, beraz, organismo bizidunen osasunean eta ongizatean. Argi dago, beraz, zer garrantzia duen metal horren toxikotasunari buruzko ikerketak, kutsatzaile emergentetzat hartzen baita (Comission 2006/66/EC; Aral & Vecchio-Sadus, 2008; 2011).

2. Arloko egoera eta ikerketaren helburuak

Goi-teknologiako produkzioan erabiltzen diren elementu emergenteen toxikotasunaren inguruan dagoen ezagutza oso baxua da. Lehorreko ekosistemetan, litioak gizakiengan eta beste organismo batzuegan eragin handia izan ahal duela jakinarazi da (Moore et al., 1995; Aral & Vecchio-Sadus, 2008; Aral & Vecchio-Sadus, 2011). Adibidez, arratoiek errinitis ultzeratiboa, metaplasia ezkatatsua, laringitis nekrosikoa eta arnas zailtasunak garatzen dituzte %80 litio karbonatoa duten aerosolekiko esposizioa jasatean. Anorexia eta deshidratazio adierazgarriak ere antzeman dira, litioarekin tratatutako pertsonetan (Greenspan et al., 1986).

Aitzitik, orain arte, litioaren erabilera handitzeak ez du ikerketa askorik eragin ekosistema urtarrean litioaren efektuak aztertzeke. Izan ere, ez dago emaitza ugari eta argirik litio-kontzentrazioari buruz ekosistema horietan, eta horrek zaildu egiten du toxikotasuna ebaluatzea. Zenbait ikerketetan litioaren toxikotasun probak egin dituzte eta kontzentrazio hilgarriak ur ekosistemetan gaur egun aurki daitezken kontzentrazioak baino askoz handiagoak izan dira (Lenntech, 2007; US EPA, 2008). *Daphnia magna* organismoarentzako efektu kontzentrazioa (EC50) 33 - 197 mg / L-koa zela zehaztu da, eta 185 - 232 mg / L-ko kontzentrazio hilkorra (LC50) mugatu da *Dreissena polymorpha* ur-gezako muskuiluarentzako (US EPA, 2008). Vallek (2019), berriz, 324 mg / L-ko LC50 identifikatu du *Littorina littorea*-rako.

Litio bezalako kutsatzaileek organismo urtarretan duten eragina aztertzeko, ekotoxikologia funtsezko tresna bihurtu da. Aldi berean, toxikotasun-probek ekosistema urtarraren babesa sortzen laguntzen dute. Toxikotasun akutuko testak erabiltzen dira litioak organismo urtar desberdinetan duen eragina zehazteko (US EPA, 2008; Valle, 2019); izan ere, erantzun akutuek bibalbioek duten kutsatzaileekiko sentikortasun-atariei buruzko informazioa ematen dute. Honen bidez, kontzentrazio hilkorra (LC50) eta erantzun hilgarriaren denbora (LT50) bezalako parametroak kalkulatu daitezke (Crane et al., 1995).

Ikusi bezala, zenbait datuk adierazten dute Li kontzentrazio handiek ondorio ugari eragin ahal dituztela organismoetan. Aldiz, toxikotasun subletalaren efektuei buruzko datu gutxi daude. Izan ere, Li bezalako ingurumen-kutsatzaileek, kontzentrazio handietan muskuiluetan ondorio larriak eragiteaz gain, efektu subletalak ere eragin ditzakete kontzentrazio baxuetan, ingurumenean aurkitu ditzakegun bezalakoetan. Hortaz, toxikotasun akutuen atari-mailatik beherako kontzentrazioak ere interesgarriak dira efektu subletalaren ikerketarako eta epe luzearako efektuak aztertzeko. Beraz, ondorioak eta estresa antolamendu biologikoaren maila desberdinetan aztertu behar dira (organoak eta azpi-organoak), erantzun biologikoak sortu ahal duten kontzentrazioak ezarritik. Toxikotasun subletalaren probek metalen eta itu-molekularren eta zelularren arteko elkarreraginak ulertzen laguntzen dute; interakzio horiek aldaketa histokimiko, histologiko eta biometrikoetan ikusi daitezkeelarik.

Kutsadurak eta ingurumeneko beste faktore estresagarri batzuek muskuiluetan erantzun metabolikoa eragiten dute, eta horrek ehun, zelula eta molekula mailako berrantolaketak eragiten ditu. Biomarkatzaileak erabiltzen dira kutsatzaile desberdinen eragina ebaluatzeko, hala nola lisosomen tamaina, morfologia eta egonkortasuna; edo liseri epitelioaren osakeraren aldaketa eta integritatearen galera bezalako alterazio histopatologikoak (Marigomez & Baybay-Villacorta, 2003; Izagirre et al., 2009; Izagirre & Marigomez, 2009).

Gaur egun, muskuiluetan lisosomen hiru erantzun nagusi daude ingurumen-estresaren aurrean: lisosoma-mintzaren ezegonkortasuna murriztea, lisosomen bolumen handipena eta lisosomen edukiaren aldaketak, hala nola lipofusina edo lipido neutroen metaketa (Marigomez & Bay-Villacorta, 2003; Davie & Vethaak, 2012; Blanco, 2018). Bestalde, zenbait organo eta ehunetako alterazio histopatologikoak azter daitezke batez ere brankiak, digestio-guruinak eta gonadetan, hauek ehun-mailako biomarkatzaileak baitira. Aldaketa horiek asaldurak adierazten dituzte antolamendu biologikoaren hainbat mailatan, eta adierazle sentikorak eta fidagarriak dira espezie urtarren osasun goera orokorraren ebaluazioa burutzeko.

Kutsaduraren jarraipenerako programetan eta esperimentu toxikologikoetan, muskuiluak behatzaile gisa erabiltzen dira, daukaten ezaugarri biologiko/ekologikoengatik (Goldberg, 1975; Davies & Vethaak, 2012; Beyer et al., 2017). Animalia sesilak dira, iragaziz elikatzen direnak, jarduera metaboliko txikia dute eta ingurumeneko kutsaduraren adierazgarri dira. Ingurumenaren estresarekiko tolerantzia erlatiboa dute eta kutsatzaile ugari metatzeko ahalmen handia ere (Goldberg, 1975). Gainera, laborategian erlatiboki erraz mantentzen direnez, oso erabiliak dira esperimentazioan. Beraz, litioarekiko esposizioaren efektuak *Mytilus galloprovincialis* organismoan aztertuko dira ekosistema itsastarreko eredu gisa.

Hau jakinda, litioak muskuiluetan efektu toxikoa izan dezake eta efektu-kontzentrazioak zehatzago definitu behar dira ekosistemetan izan ditzaketen eragina ebaluatzeko. Horrela, hauek dira planteatzen diren helburuak:

- Litio (Li) kontzentrazio hilgarria zehaztea *Mytilus galloprovincialis* muskuiluarentzako.
- *Mytilus galloprovincialis* muskuiluaren litioarekiko esposizioak ekar ditzakeen efektu subletalak aztertzea bere arriskua zehazteko.

3. Ikerketaren muina

3.1. Organismoa

Toxikotasun-probetan, 2,5 – 3,5 cm-ko luzerako muskuiluak erabili ziren. Itsasbeheraren marka-maila baxuan jaso ziren Plentzian (Euskal Kostaldea; 43°24'N, 2°55'W) 2019ko urrian.

Muskuilu laborategira eraman ziren, eta 20 L-ko polietilenoazko ontzietan eduki ziren. 14 egunez aklimatatu ziren etengabeko itsasoko ur fluxuarekin, eta hiru egunez behin elikatu ziren. Aklimatazioaren ondoren, animaliak esposizio-esperimentuetarako erabili ziren.

Aklimatazio eta esperimentazioan zehar hauek izan ziren mantendu zireneko laborategi baldintzak: uraren tenperatura, 18-19 °C; pH, 7,8; eroankortasuna: 48.000-51.000 Ω eta gazitasuna, 33 PSU. Esperimentuetan erabilitako janari komertziala *Isochrysis spp.*, *Tetraselmis spp.*, *Pavlova spp.*, *Pavlova spp.*, *Nannochloris spp.* eta *Spirulina spp.* algen nahasketa (1:10; 3,5 mL; Acuinuga, Coruña, Espainia) izan zen.

3.2. Diseinu esperimental

Litioa LiCl gisa aplikatu zen (>99, ACROS, USA) bi esperimentuetan. *Stock* soluzio bat prestatu zen (5 g Li / L), 31,25 g LiCl 0,2 µm-tara iragazitako itsasoko ur litro batean diluituz.

Fibonacci-ren eskala erabili zen esperimentu akutuan konposatu kimiko honen 8 esposizio-kontzentrazioak hautatzeko. *Littorina littorea*-ren toxikotasun akutuko proban (Valle, 2019) hautatutako esposizio-kontzentrazioak kontuan harturik, hautatu ziren esposizio-kontzentrazioak: 0 (kontrola), 2, 5, 13, 34, 89, 233, 610 mg/L Li. Beraz, 8 talde esperimental ezarri ziren, talde bakoitzeko 3 erreplika ezarri. Erreplika bakoitzean 5 muskuilu 0,5 L-ko polietilenoazko ontzietan eduki ziren, aireztapen etengabea, 9 egunez. Uraren aldaketa 2 egunero egin zen amonio/amonia kontzentrazioa 0,5 mg/L-tik behera izateko.

Hilkortasuna zehazteko talde esperimentalak egunero aztertu ziren. Muskuiluak hiltzat jo ziren balbak irekita edo partzialki irekita zeudenean eta manipulazioari erantzuten ez zutenean. Hildako espezimenen kopurua egunero ontzietatik kendu eta anotatu zen. Heriotza-tasari buruzko datuak erabili ziren kontzentrazio hilgarriaren batezbestekoa (LC50) eta erantzun hilgarriaren denbora (LT50) kalkulatzeko.

Esperimentu akutuko emaitzak kontuan izanik, histopatologia eta histokimika aztertzeko nahian, epe motzeko esperimentu subletalak burutu ziren muskuiluak hurrengo Li kontzentrazioetan mantenduz 7 egunetan zehar: kontrola, 1 mg/L (baxua), 50 mg/L (moderata), 100 mg/L (altua). Kontzentrazio bakoitzerako 50 muskuilu 10 L-ko polietilenoazko ontzietan eduki ziren, aireztapen etengabea. Uraren aldaketa 2 egunero egin zen.

Histopatologia eta histokimikarako laginak hartu ziren esperimentuaren hasieran (T0) eta 7 egun pasa eta gero (T7), bien arteko konparazioa burutu ahal izateko. T0 taldeko muskuiluek ez zuten Li-rikiko esposiziorik jasan, horrek esperimentuaren kontrol orokorra izateko gaitasuna ematen baitu. Analisi histopatologikorako, parafinan sartutako 10 indibiduen zeharkako ebakiak burutu ziren organo guztien behaketa egiteko. Analisi histokimiko eta biokimikarako beste 10 indibiduen oinak, brankiak eta liseri-guruinak biltegitatu ziren -80°C hozkailuetan nitrogeno likidoz izoztu ondoren. Histopatologiarako laginak hematoxilina-eosinaz tindatu ziren mikrotomoarekin parafinazko 0,5 µm-ko ebaketak egin ondoren. Azkenik, argi-mikroskopioan aldaketa histologikoak identifikatu ziren (2. Irudia).

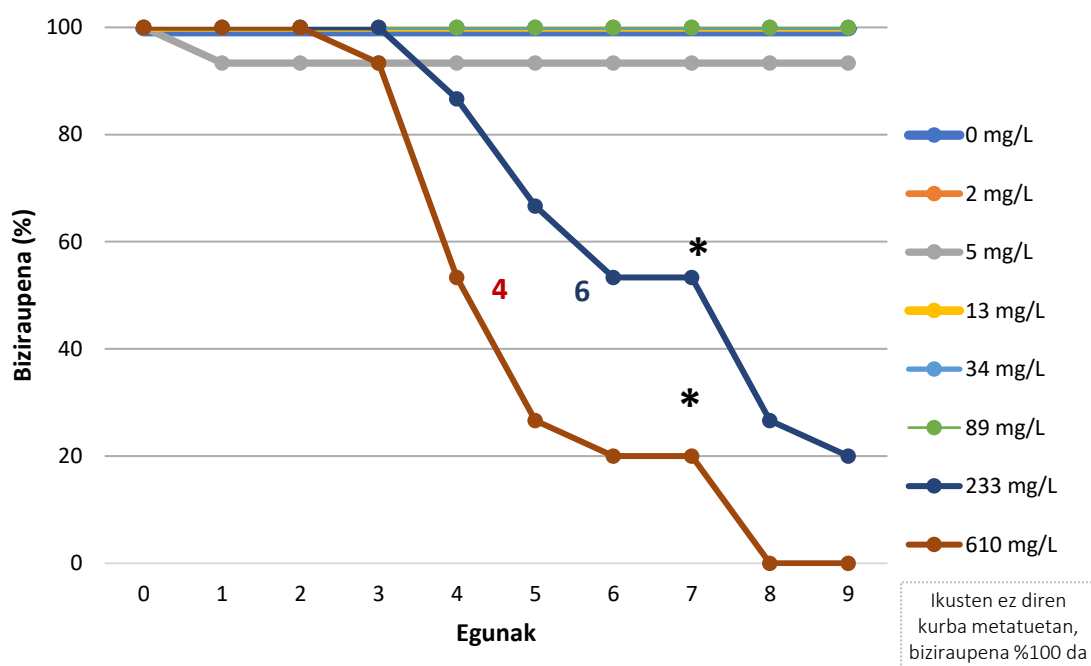
3.3. Estatistika

Analisi estatistikoak IBM SPSS 25.0 erabiliz egin ziren. LC10 eta LC50 zehazteko, Probit analisisa erabili zen dagozkien denbora-tarteetan. Kaplan-Meier proba ez-parametrikoaren bidez biziraupen-kurben arteko aldeak aztertu ziren. % 95eko adierazgarritasun-maila (p = 0,05) ezarri zen.

3.4. Emaitzak

Egindako toxikotasun akutuko probaren bidez lortutako hilkortasun-datuak Li-ak *M. galloprovincialis*-rengan duen toxikotasun akutua ebaluatzeko erabili ziren. Datu horiek talde esperimentalen biziraupen metatuko kurbak eraikitzeke erabili ziren (1. irudia). Esperimuntuan zehar ez zen hilkortasun nabarmenik neurtu kontrolean eta kontzentrazio baxuetan. Bakarrik muskuilu bat hil zen 5mg/L kontzentrazioan, hilkortasuna 10% baino baxuagoa izan zelarik. Biziraupena nabarmenki gutxitu zen ($p < 0,05$) bi kontzentrazio altuenetan (233 mg/L eta 610 mg/L) kontrolarekin konparatuz. Hilkortasuna %80-ra heldu zen 9 egun eta gero, 233 mg/L Li-pean egondako muskuiluetan. Kontzentrazio altuenean (610 mg/L), berriz, azken egunerako muskuilu guztiak hilda zeuden. Hilkortasuna 100%-ekoa izan zen 8. egunean. Biziraupen-denbora luzeenak 233 mg/L baino kontzentrazio txikiagoetan erregistratu ziren (0, 2, 5, 13, 34, 89 mg/L). Li-ren kontzentrazio altuenaren eraginpean zeuden muskuiluetan LT50 txikiagoa izan zen, 4 egun, eta 233 mg/L Li-ren eraginpean zeuden muskuiluetan, aldiz, 6 egun.

Toxikotasun akutuen proban lortutako hilkortasun-datuak kontzentrazio hilgarriaren balioak zehazteko erabili ziren (LC10 eta LC50) (1. taula). 9 eguneko 153.9 mg/L Li-ko LC50 balioa lortu zen *M. galloprovincialis* muskuilurako. Bestalde, LC10a, populazioaren %10a hiltzeko behar den kontzentrazioa adierazten duen datua, 15.1 mg/L da eta LC90, populazioaren %90 hiltzeko behar den kontzentrazioa adierazten duen datua, 551.6 mg/L-koa da.

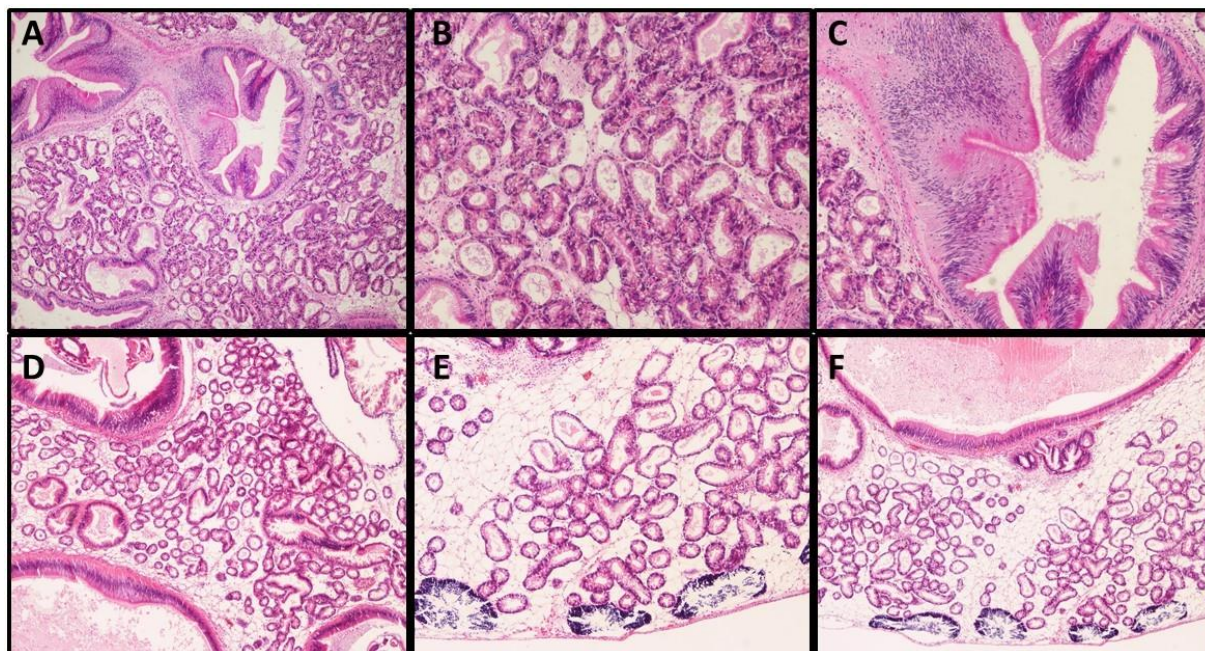


1. irudia. Li kontzentrazio desberdinpean egondako muskuiluen (*M. galloprovincialis*) biziraupen kurba metatuak (0-610 ppm). Izartxoek diferentzia nabarmenak adierazten dituzte kutsatzailen kontzentrazio desberdinen eraginpean dauden muskuiluen artean. Zenbakiak talde esperimental bakoitzeko LT50 adierazten dute.

1. taula. Kontzentrazio hilgarriaren (mg/L) balioak (LC10, LC50 eta LC90) Li-ren eraginpean dauden muskuiluentzat.

DENBORA(EGUNAK)	LC10 (mg/L)	LC50 (mg/L)	LC90 (mg/L)
4	9.4	1665.4	228808.5
5	11.9	430.9	15569.3
6	12.2	310.6	1849.4
7	12.2	310.6	1849.4
8	15.2	165.2	615.4
9	15.1	153.8	551.5

Esperimentu subletalari dagokionez, analisi histopatologikoa burutu egin zen argi-mikroskopia erabiliz (2. Irudia). Antzeman zitezkeen aldaketen artean, liseri-epitelioaren altueraren murrizketa dago. Kontrolean epitelioaren lodiera handia da, kontzentrazio altuko indibiduoaren epitelioarekin konparatuz. Gainera, liseri-albeoloen epitelioaren altueraren murrizketa ere antzeman daiteke. Bestalde, liseri-albeoloen arteko ehun konektiboaren kantitatearen emendaketa ematen da kontzentrazio altuko muskuiluetan, liseri-albeoloen degradazioa eman delako seinale.



2. irudia. *M. galloprovincialis* muskuiluaren liseri guruinaren mikrografia 7. egunean (T7), hematoxilina-eosinaz tindatuz. A, B eta C: kontrol indibiduoaren liseri guruina. D, E eta F kontzentrazio altuko (100 mg/L Li) indibiduoaren liseri guruina.

4. Ondorioak

M. galloprovincialis muskuiluentzako LC50 153.8 mg/L Li-koa izan zela ikusi zen, 9 eguneko esposizioaren ondoren. Lortutako LC50 *Dreissena polymorpha* eta *Litorina littorearentzat* emandakoak (185 – 232 mg/L, US EPA, 2008; 324 mg/L, Valle, 2019) baino txikiagoa izan arren, itsasoko uretan dauden litio-kontzentrazioak baino handiagoa izaten jarraitzen du (0,17 – 0,19 mg/L; Reimann & Caritat, 2012). Hala ere, Li-ren eragin kimikoa ez da gutxietsi behar, sortzen dituen efektu histopatologikoak kontuan hartu behar baitira. Hortaz, kutsatzaile emergentetzat hartzen denez, oso garrantzitsua da metal honen azterketa sakona egitea, etorkizunean sor dezakeen ingurumen-inpaktua txikiagotzeko.

5. Etorkizunerako planteatzen den norabidea

Alde batetik, aurreko emaitza histopatologikoen analisi kuantitatiboak egingo lirarteke, parametro desberdinak zehaztasunez alderatu eta aztertu ahal izateko. Horretaz gain, analisi histokimikoak burutuko lirarteke. Haien artean lipofuszen kontzentrazioaren emendaketa, lipido neutroen metaketa, lisosomen mintzaren egonkortasuna eta hauen aldaketa morfologikoa. Azkenik, analisi biokimikoak burutzea ondo legoke. Honela, biomarkatzaile guztien integrazioz, metal honen eraginaren ondorio zehatzak eta argiak ateratzea lor daitekeelako.

Bestetik, litioaren eskaera handitu ahala, gailu elektronikoak eta ibilgailu elektrikoak sortzeko nahia ere handitu egingo da, eta metal hau birziklatzeko helbururik sartu ezean, haren inpaktua ingurumenean gero eta bortitzagoa izango da. Hori dela eta, etorkizuneko ikerketaren ikuspegitik, Li sakon aztertu behar da haren efektu biologikoak ulertzeko. Hortaz, interesgarria izango litzateke ekotoxikologiari eta ingurumenari dagokionez egokiak diren kontzentrazioak erabiltzea, muskuiluetan zer nolako efektuak sortzen dituzten deskribatu ahal izateko.

Horretarako, LC10 balioak kontuan hartu beharko genituzke. Kontzentrazio altuena 15 mg/L Li baino baxuagoa izan beharko litzateke. Izan ere, kontzentrazio horretan, populazioaren %10 hilko litzateke eta kontzentrazio hori baino baxuagoak kontzentrazio subletaltzat hartuko liriateke. Hori horrela, lau Li kontzentrazio desberdin erabili ahal zitezkeen: kontrola, 0.1 mg/L (baxua), 1 mg/L (moderatua), 10 mg/L (altua). Kontzentrazio baxu gisa Reimann eta Caritat-ek (2012) ur gazian aurki daitezken Li kontzentrazioa hartuko litzateke (0.17-0.19 mg/L Li). Kontzentrazio moderatua eta altua aldiz, litio metalaren erauzketa guneetan aurki daitezkeen kontzentrazioak izango liriateke, zonalde hauetan sor daitezkeen efektuak aztertzen lagunduz (Aral & Vecchio-Sadus, 2008; 2011).

6. Erreferentziak

Aral, H., & Vecchio-Sadus, A. (2008). Toxicity of lithium to humans and the environment—a literature review. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 70(3), 349-356.

Aral, H., & Vecchio-Sadus, A. (2011). Lithium: Environmental Pollution and Health Effects. *Encyclopedia of Environmental Health*, 499-508.

Beyer, J., Green, N. W., Brooks, S., Allan, I. J., Ruus, A., Gomes, T., ... & Schøyen, M. (2017). Blue mussels (*Mytilus edulis spp.*) as sentinel organisms in coastal pollution monitoring: a review. *Marine environmental research*, 130, 338-365.

Blanco, E. (2018). *Contribution to the development of Best Available Practices (BAPs) for a multi-biomarker approach in sentinel mussels based on a better understanding of the influence of confounding factors on biomarker values and responsiveness*. (International PhD Thesis). Plentziako Itsas Estazioa (PiE – UPV / EHU), Bizkaia.

Comission Staff Working Document on the evaluation of the Directive 2006/66/EC on batteries and accumulators and waste batteries and accumulators and repealing Directive 91/157/EEC.

Crane, M., Delaney, P., Mainstone, C., & Clarke, S. (1995). Measurement by in situ bioassay of water quality in an agricultural catchment. *Water Research*, 29(11), 2441-2448.

Davies, I. M., & Vethaak, A. D. (2012). Integrated Marine Environmental Monitoring of Chemicals and Their Effects. *ICES Cooperative Research Report*, 315. ICES: Copenhagen. 277 pp.

Dent, S. F., & Eisenhauer, E. A. (1996). Phase I trial design: are new methodologies being put into practice. *Annals of Oncology*, 7(6), 561-566.

Goldberg, E. D. (1975). The mussel watch—a first step in global marine monitoring. *Mar. Pollut. Bull.* 6, 111.

Greenspan, B. J., Allen, M. D., Rebar, A. H., & Boecker, B. B. (1986). Inhalation toxicity of lithium combustion aerosols in rats. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A Current Issues*, 18(4), 627-637.

International Energy Agency (IEA). (2017). Tracking clean energy progress 2017.

Izagirre, U., & Marigómez, I. (2009). Lysosomal enlargement and lysosomal membrane destabilisation in mussel digestive cells measured by an integrative index. *Environmental pollution*, 157(5), 1544-1553.

Izagirre, U., Ruiz, P., & Marigómez, I. (2009). Time-course study of the early lysosomal responses to pollutants in mussel digestive cells using acid phosphatase as lysosomal marker enzyme. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 149(4), 587-597.

Kabata-Pendias, A., & Mukherjee, A. B. (2007). *Trace elements from soil to human*. Berlin: Springer Science & Business Media.

Kjølholt, J., Stuer-Lauridsen, F., Skibsted Mogensen, A., Havelund, S. (2003). The Elements in the Second Rank—Lithium. Miljøministeriet, Copenhagen, Denmark. Retrieved from https://www.miljoegressourcer.dk/filer/lix/2457/87-7972-492-2_Milj_projekt_nr_770_2003_.pdf.

Lebedeva, N. P., & Boon-Brett, L. (2016). Considerations on the chemical toxicity of contemporary Li-ion battery electrolytes and their components. *Journal of The Electrochemical Society*, 163(6), A821.

Lenntech. (2007). Lithium and water: reaction mechanisms, environmental impact and health effects. Retrieved from <https://www.lenntech.com/periodic/water/lithium/lithium-and-water.htm>.

Malgor, V. (2016). Farmacología De Las Sales De Litio. *Farmacología General y Del Sistema Nervioso Autónomo* (pp. 153-161).

Marigómez, I., & Baybay-Villacorta, L. (2003). Pollutant-specific and general lysosomal responses in digestive cells of mussels exposed to model organic chemicals. *Aquatic Toxicology*, 64(3), 235-257.

Marigómez, I., Ireland, M. P., & Angulo, E. (1990). Correlation of cadmium shell-weight index with environmental stress indicators at the cellular and organismic levels in *Littorina littorea*. *Marine Ecology Progress Series*, 171-176.

Marigómez, J. A., & Ireland, M. P. (1990). A laboratory study of cadmium exposure in *Littorina littorea* in relation to environmental cadmium and exposure time. *Science of the total environment*, 90, 75-87.

Moore, J. A. (1995). An assessment of lithium using the IEHR evaluative process for assessing human developmental and reproductive toxicity of agents. *Reproductive Toxicology*, 9(2), 175–210.

Nielsen, F.H. (1988). Ultra-trace minerals. In Shils, M.E., Olson, J.A., Shike, M. & Ross, A.C. (Eds.), *Modern Nutrition in Health and Disease* (pp. 278–291). Philadelphia: Lea and Febiger.

Penel, N., & Kramar, A. (2012). What does a modified-Fibonacci dose-escalation actually correspond to?. *BMC medical research methodology*, 12(1), 103.

Reimann, C., & De Caritat, P. (2012). *Chemical elements in the environment: factsheets for the geochemist and environmental scientist*. Berlin: Springer Science & Business Media.

Soto, M., Ireland, M. P., & Marigómez, I. (2000). Changes in mussel biometry on exposure to metals: implications in estimation of metal bioavailability in 'Mussel-Watch' programmes. *Science of the total environment*, 247(2-3), 175-187.

Swarnakar, Arvind & Choubey, Dr.Shweta. (2014). Hazardous chemical present in Batteries and their impact on Environment and Humans. Retrieved from <https://www.researchgate.net/publication/274636169>.

US EPA. (2008). ECOTOX retrieval database.

Valle, A. (2019). *Evaluación de la toxicidad de contaminantes metálicos emergentes (Tl y Li) mediante bioensayos de adherencia en bígamos*. (Master Thesis). Plentziako Itsas Estazioa (PiE – UPV / EHU), Bizkaia.

Zeng, X., Li, J., & Singh, N. (2014). Recycling of spent lithium-ion battery: a critical review. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 44(10), 1129-1165.

7. Esker onak

Eskerrik asko Tifanie Briaudeauri ikerketa proiektu honekin lagundu eta hainbeste irakatsi izanagatik. Eta aldi berean, eskerrik asko Denis Benitori, egun askotan zehar laborategian nirekin egon izanagatik eta ikerketa-mundua zer den erakusteagatik.