

MARIOLA GARCZYŃSKA, ANNA MAZUR, JOANNA KOSTECKA

Zakład Biologicznych Podstaw Rolnictwa i Edukacji Środowiskowej
Wydział Biologiczno-Rolniczy, Uniwersytet Rzeszowski
e-mail: mgarczynska1@o2.p; jkosteck@univ.rzeszow.pl

WYBRANE ASPEKTY TOKSYKOLOGII DŹDŻOWNIC W KONTEKŚCIE ZRÓWNOWAŻONEGO ROZWOJU

*Gleba, stanowiąca podstawę łańcuchów pokarmowych, jest obciążona przez wiele substancji toksycznych. Wpływa to niekorzystnie nie tylko na jej zróżnicowanie biologiczne, ale także na wielkość i jakość plonów. Zastosowanie dżdżownic (*Lumbricidae*) do monitoringu zanieczyszczeń gleby posiada wiele zalet. Ich przewaga jako bioindykatorów w tym środowisku, wynika z faktu, że mają kontakt z glebą zarówno poprzez powierzchnię zewnętrzną ciała jak i wewnętrznie, przez przewód pokarmowy. Właściwości bioindykacyjne dżdżownic przejawiają się na różnych poziomach; począwszy od całych populacji (biowskaźniki) aż do zmian fizjologicznych czy biochemicznych, zachodzących w komórkach czy też poszczególnych organellach (biomarkery). Z tego też powodu eksperymenty prowadzone są zarówno w terenie, jak i w laboratorium i przewiduje się, że rola dżdżownic w badaniach toksykologicznych będzie wzrastała. Zmiany zachodzące pod wpływem stresora/toksyny w ich komórkach mogą stanowić łatwą i tanią metodę oceny zanieczyszczenia gleb różnymi związkami. Jest to ważne z punktu widzenia dbałości o jakość gleby – istotną dla zrównoważonego rozwoju i ochrony środowiska.*

Słowa kluczowe: dżdżownice *Lumbricidae*, toksykologia środowiska, zrównoważony rozwój

I. WSTĘP

Stosowanie zasad zrównoważonego rozwoju powinno prowadzić między innymi do utrzymania wysokiej różnorodności biologicznej gleb, a w konsekwencji także do produkcji żywności wysokiej jakości. Tymczasem na skutek działalności przemysłowej, rolniczej czy komunikacyjnej, w glebie, stanowiącej podstawę łańcuchów pokarmowych, zachodzą niekorzystne zmiany. Jest ona obciążona przez szereg czynników, w tym nadmiar metali ciężkich, nawozów i środków ochrony roślin. Wpływają one niekorzystnie na organizmy glebowe [11] uczestniczące w procesach homeostatycznych, a także na jakość plonów [4]. W celu lepszego poznania toksyczności związków występujących w środowisku, określa się faktyczne Ryzyko Ekologiczne (*Ecological Risk Assessment...*) ich obecności, używając przy tym licznych gatunków bezkręgowców, w tym dżdżownic (*Lumbricidae*) [28]. Zastosowanie dżdżownic jako organizmów biowskaźnikowych do monitoringu skażenia gleby posiada wiele zalet. Są to zwierzęta szeroko rozpowszechnione, pospolite i łatwe w hodowli laboratoryjnej. Mają także stosunkowo krótki cykl życiowy i dużą rozrodczość [20].

* *Pracę recenzował:* prof. UP w Poznaniu, dr hab. Krzysztof Kasprzak

Celem opracowania jest przedstawienie aktualnych tendencji i kierunków badań toksykologicznych z użyciem dżdżownic w aspekcie zrównoważonego rozwoju. Niniejsza praca ma również za zadanie uwypuklić konieczność dalszych eksperymentów nad zastosowaniem dżdżownic w ekotoksykologii.

II. ZASTOSOWANIE DŹDŻOWNIC W TESTACH EKOTOKSYKOLOGICZNYCH

Dżdżownice są dobrymi bioindykatorami skażenia środowiska glebowego, stosuje się je do rekultywacji gleb, używa w biomonitoringu i ekotoksykologii [9,10,18]. Organizmy te mają duży zakres tolerancji ekologicznej na czynniki środowiskowe więc mogą być użyte do testowania stanu gleb naturalnych i antropogenicznych. W testach toksyczności pospolicie używanymi gatunkami są *Eisenia fetida fetida* (Sav.) i *Eisenia fetida andrei* (Bouche) [14]. Stwierdzono różnice w reakcji na ksenobiotyki u gatunków reprezentujących różne typy ekologiczne (epigeiczny, endogeiczny i anecigeiczny) co jest związane z ekologią i fizjologią poszczególnych grup [25].

Najczęściej w warunkach laboratoryjnych określa się wpływ ksenobiotyku na przeżywalność, biomasę i rozrodczość (ilość i masę wytworzonych kokonów). Według ISO (*International Standard Organisation*) wpływy ksenobiotyków na dżdżownice testuje się w czterech testach: bibułowym, sztucznej gleby, artisolowym i teście unikania odpowiedzi [16,24]. W wymienionych testach przebadanych zostało szereg substancji [6,12,21,23]. Badano ich wpływ na pojedynczego osobnika i całe populacje, stwierdzając między innymi, że zmiany w populacjach mogą generować powstanie populacji odporniejszej na skażoną glebę. Tolerancja na dany czynnik stresowy może być niedziedziczna (aklimacja), lub może wyewoluować odporność dziedziczną przez potomstwo. Jak wykazują badania, u dżdżownic utrzymywanych w podłożu skażonym metalami tolerancja na skażenie wzrasta [29].

U organizmów narażonych na warunki stresowe zmienia się fizjologia, ponieważ większa część energii (kosztem innych procesów życiowych, np. rozmnażania), musi zostać zużyta na procesy związane z detoksykacją trucizn. U dżdżownic może wystąpić silna biomagnifikacja czyli wzrost stężenia ksenobiotyku lub jego metabolitu wraz z wyższym poziomem łańcucha troficznego. Biomagnifikacja DDD i DDT doprowadziła do wyginięcia wielu gatunków ptaków drapieżnych i nietoperzy [5]. Dżdżownice wykazują również tendencję do biomagnifikacji związków rtęci (metylortęci), chlorofenoli i policyklicznych węglowodorów aromatycznych [5].

III. KOMÓRKI DŹDŻOWNIC JAKO BIOMARKERY SKAŻENIA ŚRODOWISKA

Celomocyty dżdżownic mogą reagować subkomórkowymi zmianami na skażenia środowiska. Jednym z prostych biomarkerów, świadczącym o zaburzeniach na poziomie komórki, powodowanych przez różne toksyny jest czas retencji czerwieni obojętnej. W metodzie tej czerwień jest pinocytowana i akumulowana przez lizosomy celomocytów dżdżownic, natomiast czas retencji jest znacznie krótszy w lizosomach poddanych działaniu stresu. Wskaźnik ten był wykorzystywany w badaniach oceny toksyczności metali ciężkich (głównie Cu, Cd, Zn, Pb i Ni) [26,31,32] oraz pestycydów (np. diazinonu i chlorpyrifosu) [2,3].

Badania z użyciem dżdżownic do biomonitoringu zanieczyszczenia gleby metalami przyczyniły się do dokładniejszego scharakteryzowania metalotionein. Okazało się, że wiązanie nadmiaru jonów metali z grupy B oraz z grupy przejściowej z metalotioneinami jest mechanizmem biorącym udział w detoksykacji na poziomie komórkowym. W przypadku

dżdżownic narażonych na wysokie stężenia metali ciężkich w glebie, stwierdzono podwyższoną syntezę metalotionein, jako zwiększenie wydajności detoksykacji [1].

W obronie organizmu przed zgubnymi skutkami działania czynników stresogennych, w tym podwyższonej temperatury, biorą udział białka szoku cieplnego. Ich wzmożona ekspresja występuje, gdy komórki są narażone na szkodliwy czynnik, a podwyższony poziom tych białek wskazuje na przekroczenie progu toksyczności [8].

Przykładowo, niekorzystne działanie pestycydów fosforoorganicznych (OP) i karbaminianów (CB), które są szeroko używane w nowoczesnym rolnictwie, polega na hamowaniu aktywności esteraz a zwłaszcza acetylocholinesterazy (AChE). Jest ona znana jako jeden z lepszych biomarkerów ze względu na ścisłą zależność między spadkiem syntezy AChE a obniżeniem kondycji dżdżownic poddanych działaniu szkodliwych substancji [7].

Indukcja systemu monoooksygenaz związanych z cytochromem P-450 jest kolejnym markerem używanym do oceny skażenia toksycznymi substancjami zarówno z użyciem kręgowców jak i bezkręgowców [17] Lukkari i in. [15] zaobserwowali indukcję P450 u *Aporrectodea tuberculata* narażonej na wysokie stężenia Cu i Zn w glebie nieopodal huty stali. Jednak możliwość użycia tego biomarkera do oceny skażenia środowiska pestycydami wymaga licznych badań. Wątpliwości budzi stosunkowo niski poziom ekspresji P450 u dżdżownic w porównaniu do ssaków czy ryb narażonych na degradacyjne czynniki [22].

Przeprowadzono również badania dotyczące wpływu ksenobiotyków na aktywność enzymatyczną peroksydazy lipidowej, katalazy i transferazy S-glutationu. Saint-Denis i in. [26] wykazali, że u dorosłych osobników *Eisenia fetida andrei*, Pb w stężeniach 30, 60, 120 i 250 mg/kg⁻¹ indukuje syntezę peroksydazy lipidowej a obniża syntezę transferazy S-glutationu, który odpowiada za metabolizm ksenobiotyków. Z kolei stwierdzono indukcję peroksydazy lipidowej oraz zwiększenie aktywności enzymatycznej katalazy pod wpływem benzopirenu [27]. Ilość badań na dżdżownicach z użyciem tych enzymatycznych biomarkerów jest jednak niewielka, również niska jest liczba testowanych związków toksycznych.

Najnowsze techniki biologii molekularnej znalazły zastosowanie również w badaniu ekotoksykologii dżdżownic. Przykładowo, metodą elektroforezy pojedynczych jąder komórkowych w żelu agarozowym, można badać stopień uszkodzenia przez czynniki genotoksyczne materiału genetycznego komórki oraz skuteczność mechanizmów naprawczych [19]. Prowadzi się także liczne badania dotyczące zmiany ekspresji wielu genów pod wpływem czynników degradacyjnych [1,30]. Zakres uszkodzeń DNA można więc uznać za biomarker narażenia na dany czynnik. Jeśli będzie można znaleźć powiązania między działaniem danego związku chemicznego na DNA a jego efektem w organizmie, będzie wtedy można wykorzystywać biomarkery skutków [13]. Użycie biomarkerów genetycznych jako obrazu skażenia środowiska, wymaga jednak jeszcze licznych badań, gdyż wiele związków o właściwościach genotoksycznych występuje powszechnie w środowisku i trudno odnieść zmiany powodowane w DNA do konkretnych substancji chemicznych.

IV. PODSUMOWANIE

W ostatnich latach nastąpił znaczny wzrost zainteresowania badaniami toksykologicznymi z udziałem dżdżownic, zarówno w warunkach laboratoryjnych jak i w terenie. W przyszłości niezbędne będzie prowadzenie liczniejszych doświadczeń w warunkach naturalnych, gdzie będą mogły być brane pod uwagę oddziaływania wielu czynników abiotycznych (np. kontrolowane zmiany pH, temperatury, czy wilgotności). Pomoże to znacznie w interpretacji wyników uzyskanych w skali makro. Ważne jest również przebadanie większej grupy substancji

potencjalnie szkodliwych znajdujących się w środowisku i określenie ich Ryzyka Ekologicznego. Należy podkreślić, że dla wyników tych badań istotna jest chemiczna forma badanego związku, bo może ona znacząco wpływać na rezultat prowadzonych doświadczeń.

Określenie faktycznego Ryzyka Ekologicznego dla ksenobiotyków jest bardzo trudne, ponieważ wymaga zintegrowanych metod, badających trzy linie: bioprzyzwajalność, ekologię i ekotoksykologię. W związku z tym, nieodzownym elementem dla oceny ryzyka skażenia glebowego jest stworzenie wielokryteriowej metodologii, biorącej pod uwagę kilka czynników (np. zmianę biomasy, liczebności, przeżywalności oraz reprodukcji badanych osobników).

Z kolei dobre biomarkery muszą łączyć zmiany biochemiczne i fizjologiczne organizmu ze skutkami powodowanymi na poziomie całych populacji i zespołów [13]. Wobec powyższego, jedynie badania kompleksowe, prowadzone na różnych poziomach - począwszy od ekosystemów a skończywszy na zmianach w obrębie komórki, mogą dać wyniki rzetelne i miarodajne [22].

V. LITERATURA

1. Asensio V., Kille P., Morgan A.J., Soto M., Marigomez I.: Metallothionein expression and Neutral Red uptake as biomarkers of metal exposure and effect in *Eisenia fetida* and *Lumbricus terrestris* exposed to Cd. *Soil. Biol.* nr. 43. s. 233-238. 2007.
2. Booth L.H., Hodge S., O'Halloran K.: Use of biomarkers in earthworms to detect use and abuse of field applications of a model organophosphate pesticide. nr. 67. s. 633-640. 2001.
3. Booth L.H., O'Halloran K.: A comparison of biomarker response in the earthworm *Aporrectodea caliginosa* to the organophosphorus insecticides diazinon and chlopyrifos. *Environ. Toxicol. Chem.* nr. 20. s. 2494-2502. 2001.
4. Dokument elektroniczny [www.teagasc.ie, data wejścia 22.09.2008.]
5. Ernst G., Frey B.: The effect of feeding behavior on Hg accumulation in the ecophysiologicaly different earthworms *Lumbricus terrestris* and *Octolaseon cyaneum*: A microcosm experiment. *Soil Biol. Biochem.* nr. 39. s. 386-390. 2007.
6. Gomez-Eyles J.L., Svendsen C., Lister L., Martin H., Hodson M.E., Sprugeon D.J.: Measuring and modelling mixture toxicity of imidacloprid and thiocloprid on *Caenorhabditis* and *Eisenia fetida*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 2008. (in press)
7. Hackenberger B.K., Jarič-Perkušić D., Stepić S.: Effect of temephos on cholinesterase activity in the earthworm *Eisenia fetida* (*Oligochaeta, Lumbricidae*). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* nr. 71. s. 583-589. 2008.
8. Homa J., Olchawa E., Stürzenbaum S.R., Morgan A.J., Plytycz B.: Early-phase immunodetection of metallothionein and heat shock proteins in extruded earthworm coelomocytes after dermal exposure to metal ions. *Environ Pollut.* nr. 135. s. 275-280. 2004.
9. ISO Draft: Soil quality – Avoidance test for evaluating the quality of soils and the toxicity of chemicals. Test with earthworms (*Eisenia fetida* / *andrei*). No. 17512. Geneva, Switzerland. 2004.
10. ISO Soil quality. Effects of pollutants on earthworms. Part 3: Guidance on the determination of effects in field situations. No 11268-3. Geneva. Switzerland. 1999.
11. Kabata-Pendias A., Pendias H.: Biogeochemia pierwiastków śladowych. PWN. Warszawa. 1999.
12. Landrum M., Cañas J.E., Coimbatore G., Cobb G.P., Jackson W.A., Zhang B., Anderson T.A.: Effects of perchlorate on earthworm (*Eisenia fetida*) survival and reproductive success. *Sci. Total. Environ.* nr. 363. s. 237-44. 2006.

13. Laskowski R., Migula P.: Ekotoksykologia - od komórki do ekosystemu. PWRiL. Warszawa. 2004.
14. Lowe Ch.N., Butt K.R.: A review of laboratory techniques used the cultivation of soil dwelling earthworms. Zeszyty Naukowe Południowo-Wschodniego Oddziału Polskiego Towarzystwa Inżynierii Ekologicznej z siedzibą w Rzeszowie i Polskiego Towarzystwa Gleboznawczego, Oddział w Rzeszowie. nr. 7. s. 53-61. 2006.
15. Lukkari T., Taavitsainen M., Soimasuo M., Oikari A., Haimi J.: Biomarker responses of the earthworm *Aporrectodea tuberculata* to cooper and zinc exposure: differences between populations with and without eariel metal exposure. J. Environ. Pollut. nr. 29. s. 377-386. 2004.
16. Natal da Luz T., Ribeiro L., Sousa J.P.: Avoidance tests with Collembola and Eartworms as early screening tools for site-specific assessment of polluted soils. Environ. Toxicol. Chem. nr. 23. s. 2188-2193. 2004.
17. Neng-wen X., Xiang-hui L., Wei L., Feng G.: Effect of herbicide acetochlor on cytochrome P450 monooxygenases and GST of earthworms *Eisenia fetida*. J. Environ. Sci. nr. 18. s. 135-140. 2006.
18. OECD Guideline for testing chemicals 207. Earthworms acute toxicity test. 1984.
19. Olive P.L., Banáth J.P.: The comet assay: a method to measure DNA damage in individual cells. Nature Protocols. nr. 1. s. 23-29. 2006.
20. Paoletti M.G.: The role of earthworms for assessment of sustainability and as bioindicators. Agric. Ecos. Environ. nr. 74. s. 137-155. 1999.
21. Robidoux P.Y., Svedsen C., Sarrazin M., Thiboutot S., Ampleman., Hawari G., Weeks J.M. Sunahara G.I.: Assesment of a 2,4,6,-Trinitrotoluene-Contaminated site using *Aprroducta rosea* and *Eisenia andrei* in Mescosoms. Arch. Environ. Conta. Toxicol. nr. 48. s. 56-67. 2004.
22. Rodriguey-Castellanos L., Sanchez-Hernandez J.C.: Earthworm biomarkers of pesticide contamination: Current status and perspectives. J. Pestic. Sci. nr. 32. s. 360-71. 2007.
23. Römbke J., Garcia M.V., Scheffczyk A.: Effects of the fungicide benomyl on earthworms in laboratory tests under tropical and temperate conditions. Arch. Environ. Contam. Toxicol. nr. 54. s. 590-598. 2007.
24. Römbke J.: Tools and techniques for the assessment of ecotoxicological impacts of contaminants in the terrestrial environment. Hum. Ecol. Risk Assess. nr. 12. s. 84-101. 2006.
25. Rožen A.: The annual cycle in population of earthworms (*Lumbricidae*, *Oligochaeta*) in three types of oah-hornbeam of the Niepolomnicka Forest II. Dynamics of population numbers, biomass and age structure. Pedobiol. nr. 31. s. 169-178. 1988.
26. Saint-Denis M., Narbonne J. F., Arnaud C. Ribera D.: Biochemical responses of the earthworm *Eisenia fetida andrei* exposed to contaminated artificial soil: effect of lead acetate. Soil. Biol. Biochem. nr. 33. s. 395-404. 2001.
27. Saint-Denis M., Narbonne J. F., Arnaud C., Thybaud E., Ribera D.: Bio-chemical responses of earthworm *Eisenia fetida andrei* exposed to contaminated artificial soil: effects of benzo(a)pyrene. Soil. Biol. Chem. nr. 31. s. 1837-1846. 1999.
28. Semezin E., Critto A., Rutgers M., Marcomini A.: Integration of bioavailability, ecology and ecotoxicology by three lines of evidens into ecological risk indexes for contaminated soil assessment. Sci. Total. Environ. nr. 389. s. 71-86. 2008.
29. Sprugeon D.J., Hopkin S.P.: The development of genetically inherited resistance to zinc in laboratory-selected generations of the earthworm *Eisenia fetida*. Environ. Pollut. nr. 109. s. 193-203. 2000.

30. Spurgeon D.J., Sturzenbaum S.R., Svendsen C., Hankard P.K., Morgan A. J., Weeks, J.M., Kille P.: Toxicological, cellular and gene expression responses in earthworms exposed to copper and cadmium. *Comp. Biochem. Physiol.* nr. 138. s. 11-21. 2004.
31. Svendsen C., Hankard P.K., Lister L.J., Fishwick S.K., Jonker M.J., Spurgeon D.J.: Effect of temperature and season on reproduction, neutral red retention and metallothionein responses of earthworms exposed to metals in field soils. *Environ. Pollut.* nr. 147. s. 83-93. 2007.
32. Weeks J.M., Svendsen C.: Neutral red retention by lysosomes from earthworm (*Lumbricus rubellus*) coelomocytes: a simple biomarker of exposure to soil copper. *Environ. Toxicol Chem.* nr. 15. s. 1801-1805. 1996.

SELECTED ASPECTS OF TOXICOLOGY IN EARTHWORMS IN THE CONTEXT OF SUSTAINABLE DEVELOPMENT

Summary

Soil, constituting the basis for the food chain, is burdened with many toxic substances. This has an adverse effect not only on its biological diversity but also on quantity and quality of crops. The use of earthworms Lumbricidae earthworms for monitoring of the soil pollution has many benefits. Their advantage as bioindicator in this environment results from the fact that they are in contact with the soil, both through the external surface as their bodies and also internally, through their digestive tracks. Bioindicative properties of earthworms manifest themselves on different levels beginning from whole populations, bioindicators up to physiological or biochemical changes occurring in cells or individual organnella (biomarkers). For this reason experiments are conducted both in the field as well as in the laboratory and it is expected that the role of earthworms in toxicological studies will be increasing. Changes occurring under the influence of the stressor/ toxin in their cells may constitute an easy and cheap method of assessing soil contamination with various compounds. It is important from the point of the rules of sustained socio-economic development and protection of the environment.

Key words: earthworms, *Lumbricidae*, toxicology of the environment, sustainable development