



**ZTF-FCT**  
Zientzia eta Teknologia Fakultatea  
Facultad de Ciencia y Tecnología

**BIOLOGIAKO GRADUA  
GRADO EN BIOLOGIA  
DEGREE IN BIOLOGY**

**GRADU AMAIERAKO LANA  
TRABAJO DE FIN DE GRADO  
BACHELOR'S THESIS**

**NEUTRAL RED UPTAKE (NRU) ENTSEGUAREN  
OPTIMIZAZIOA LUR-ZIZAREEN SISTEMA  
IMMUNeko ZELULEN KULTIBO PRIMARIOETAN  
OPTIMIZACIÓN DEL ENSAYO NEUTRAL RED UPTAKE  
(NRU) EN CULTIVOS PRIMARIOS DE CÉLULAS DEL  
SISTEMA INMUNE DE LOMBRICES TERRESTRES  
OPTIMIZATION OF NEUTRAL RED UPTAKE (NRU)  
TEST IN PRIMARY CULTURES OF IMMUNE SYSTEM  
CELLS OF EARTHWORMS**

**Sandra Olivares Bruzos**

**Leioa, 2014ko iraila / Leioa, Septiembre 2014 / Leioa, 2014  
September**

eman ta zabal zazu



Universidad  
del País Vasco

Euskal Herriko  
Unibertsitatea

## LABURPENA

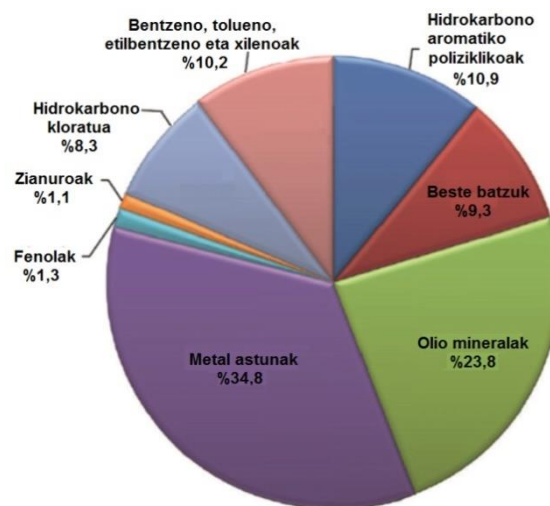
Azken urteotan eman diren kutsatzaile desberdinen gehiegizko isurpen edo erabilpena dela eta, lurzoruetan metal astunak metatu dira eta horrek, kate trofikoaren oinarrian dauden organismoen gainean kalteak sorrarazi ditu. *Eisenia fetida* zizarea espezie zentinelak gisa erabili da lur entsegu ekotoxikologikoetan. Esperimentu honetan *Eisenia fetida*-ren jariatzen zelomikoan dauden eta babes funtzioa duten zelomozitoak pH desberdinetara edo Kadmio bezalako metalera esposatzeak Neutral Red (NR) edo gorri neutro tindatzaile kationikoaren harreraren eta fagozitosi ahalmenaren eragina duen aztertu nahi izan da. Esperimentua *in vitro* egin zen 3R filosofia jarraituz. Alde batetik, pH desberdinen eraginari dagokionez gorri neutroaren harrera (NRU) entseguan erantzun bimodal bat behatu zen eta beste alde batetik, fagozitzatzeko ahalmenari dagokiola zelomozitoak Eagle medioan kultibatzean ez zen aldaketa esangarria ikusi kadmioaren, kontrolaren eta kontrol positiboaren artean. Bai ordea L-15 medioarekin, non kontrol positiboak beste biak baino absorbantzia handiagoa erakutsi zuen. Emaidak hauek erakusten dute zelomozitoen mintza gradualki kaltetzen doala pH neutrotik aldentzen doan heinean eta puntu batetik aurrera NRU emendatzen da zelomozito batzuen (amebozitoen) fagozitosia aktibatzen delako.

## AURKIBIDEA

1. Sarrera	4. orrialdea
2. Planteatutako hipotesia eta lanaren helburua	11. orrialdea
3. Material eta metodoak	12. orrialdea
3.1. Zizareak	
3.2. Zelomozitoen erauzketa	
3.3. Zelomozitoen esposizioa pH desberdinetara (NRU testa) eta kadmio eta metil merkuriora (fagozitosi froga)	
3.4. Neutral Red Uptake (NRU) testa	
3.5. Fagozitosia	
3.5.1. NR-az tindatutako Zymosan partikulen prestaketa	
3.5.2. Zelomozitoen esposaketa NR-az tindatutako Zymosan partikulei	
3.6. Analisi estatistikoa	
4. Emaitzak	15. orrialdea
4.1. NRU testa	
4.2. Fagozitosia	
5. Eztabaida	18. orrialdea
6. Ondorioak	21. orrialdea
7. Esker onak	22. orrialdea
8. Bibliografia	23. orrialdea

## 1. SARRERA

Azken hamarkadetan lurzoruen kutsadura mailaren gorakada handia egon da, bereziki, jarduera antropogenikoak direla eta. Izan ere, XX. mende hasieratik industrien jardueren eta pestizida eta fungiziden erabileraren emendioa gertatu da, batez ere 1960. eta 1980. urteen artean (Center for Integrated Pest Management, 2003). Industrietan sortzen diren ekoizkinen eta nekazaritzan maiz erabiltzen diren konposatu kimikoen erabilera masiboak lurzoruan eragin latza izan du, besteak beste, lurzorua egituraren ezegonkortasuna, lur emankortasunaren murrizpena, lurrean bizi den flora eta faunaren arteko elkarrekin asaldura eta uztaren eta lurpeko uren kutsadura eraginez (Lionetto *et al.*, 2012). Europan meatzaritzak eta mineralen galdaketek lurzorua kutsadura nagusia eragin dute eta industrietatik eratorritako metal astunak izan dira kalte handiena sortu dutenak (1. irudia) (Institute for Advanced Sustainability Studies, 2013). Lurzoruetan metal astunak maila altuetan metatzen direnean, bi aldaketa gertatzen dira besteak beste: alde batetik metalen disolbagarritasuna emendatzen da eta bestetik, pH-a nabarmenki jaisten da. Lurzoruan dauden metalak disolbagarriagoak direnez, bertan bizi edo lurrez elikatzen diren animalientzako eskuragarriagoak bihurtzen dira (Hønsi *et al.*, 2002) eta modu horretan organismoentzako toxikoagoak (Buratti *et al.*, 2011). Beste alde batetik, pH-aren aldaketek ere eskuragarritasunean eragina eduki dezakete, honela Ma eta kideek (Ma *et al.*, 1983) konturatu ziren, pH 4 duen lurzoru batean *Lumbricus terrestris* zizareak (Linnaeus, 1758) zink, kadmio eta beruna bezalako metal astunak errazago asimilatzen zituela pH neutroetan baino. Azken hamarkadetan azidotetasun handiko lurzoruen presentzia gero eta ikertuagoa dago. Adibidez, National Atmospheric Deposition Program (NADP) arabera (National Atmospheric Deposition Program, 1999), 1999. urtean Estatu Batuetako ekialdeko lurren pH-a 4.6-4.3 tartean zegoela adierazi du.



1. **Irudia:** Europako lurzoruak kaltetzen dituzten kutsatzaileak. Institute for Advanced Sustainability Studies, 2013 artikulutik eraldatuta.

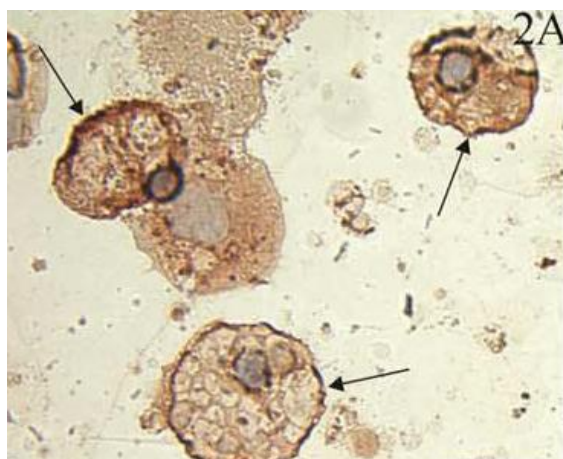
Lur-zizareak kutsaduraren zentinelak garrantzitsuak bihurtu dira azken urteotan metal kontzentrazio altua duten lurzoruetan bizitzeko eta beraien ehunetan metal astunak kontzentrazio altuetan metatzeko duten gaitasuna dela eta. Hori dela eta, Garapen eta Kooperazio Ekonomikorako Erakundeak (OECD) estandarizatutako toxikotasun testetan eredu gisa aukeratu dira (OECD, 1984), lurzoruan gertatzen diren kalteak ebaluatzeko. Test hauen helburua ingurunean erabiliko diren konposatu kimikoen toxikotasun maila estimatzea eta historikoki kutsatuak izan diren lurzoruen ebaluazioa egitea da. Zizareen kopuruan, biomasan eta espezie aberastasunean gertatzen diren aldaketak lurzoruen kutsadura adierazten dute (Ware, 2006). Lur-zizareek bi modutan esposatzen dira konposatu toxikoetara. Alde batetik, eguzki-argiarekiko sentikorrak diren organismoak izanik, lurzoruen barnean tunelak eraikitzen dituzte eta modu horretan beraien bizitza osoan zehar zuzenean lurzoruan dauden substantzia toxikoekin kontaktuan daude. Beraien epidermisa oso iragazkorra denez, uretan dauden metal astun asko eta beste xenobiotiko batzuk larruzala zeharkatu eta itu organoetan metatzen dituzte, bereiziki hestean eta hestearekin erlazonaturiko ehun kloragogenikoan. Kutsatzaile hauek lisosomen mintzak kaltetu eta aldaketa fisiologiko eta estrukturalak eragin ditzakete, hala nola, hidrolasa azidoen askapenaren emendioa zelularen zitoplasmara eta lisosomen hauskortasunaren eta pH lisosomikoaren igoera. Izan ere, hidrolasa azido hauek zitoplasmaren osagaiak apurtzen dituzte eta azkenean zelularen heriotza, nekrosi edo apoptosia eragiten dute (Antonello *et al.*, 2007). Beste alde batetik, zizareak materia organikoa deskonposatzen duten izaki ornogabeak direnez lur kantitate handiak irensten dituzte eta lurraekin batera doazen kutsatzaileak ere metatzen dituzte. Vijver eta kideek (Vijver *et al.*, 2003) ondorioztatu zuten metalen xurgatze nagusia zizarearen epidermisetik ematen dela. Beste autore batzuek, ordea, metalen metaketa nagusia ingestio bidez ematen dela uste dute. Dena den, zizareek lurzoruan dauden metalen esposizio zuzena dute.

Ikerketa honetan erabili den *Eisenia fetida* zizarea materia organikotan aberatsak diren lurzoruetan agertzen da. Ikerketa ekotoxikologiko askotan zizareen artean gehien erabiltzen dena da (1. taula), besteak beste bere garrantzi ekologikoa dela eta emaitza adierazgarriak eskaintzen dituelako. Gainera, laborategiko baldintzetan erraz hazi eta mantendu daiteke eta bere bizi zikloa motza da (zizare bakar batek astero 2-5 kapulu jartzen ditu eta 8 astetan eta 20°C-tan heldu bihurtzen dira) (Lionetto *et al.*, 2012).

1. **Taula.** Hiru irizpideen araberako laborategi testetan erabilitako lurzoruko ornogabeen sailkapena Donker *et al.*, 1993 liburutik eraldatuta.

Testean erabilitako ornogabe espezieak		Garrantzi ekologikoa; agerpena babestutako ekosistemetan	Kultiboa estandarizatzeko eta laborategi desberdinetan erabiltzeko gaitasuna	Testaren emaitzak ingurunearen kalitatearen irizpideak definitzeko erabilgarriak
Protozooak	Colpoda cuculus	+	+	—
Nematodoak	Plectus acuminatus	+	+	—
Isopodoak	Porcelio scaber	+	—	±
	Trichoniscus pusillus	+	—	±
Akaroak	Platynothrus peltifer	+	—	±
Kolenboloak	Folsomia candida	+	+	+
	Orchesella cincta	+	±	±
Enchytraeidae	Enchytraeus albidus	±	+	+
Lumbricidae	Eisenia fetida	—	+	+
Moluskuak	Helix aspersa	+	±	±
Himenopteroen bizkarroiak eta parasitoideak	Encarsia Formosa	±	+	—
	Trichogramma cacoeciae	+	±	—
Kakalardoak	Bembidion lampros	+	±	±
	Aleochara bilineata	+	±	±
Akaro harrapakariak	Phytoseiulus persimilis	±	+	—
Armiarmak	Oedothorax apicatus	+	—	±
Eztiaren erleak	Apis mellifera	+	+	±

Zizareek zuzenean lurzoruekiko eta patogenoekiko duten esposizio etengabe hori dela eta, babes eta immunitate mekanismoak garatu dituzte. Cooper ikerlariaren arabera (Cooper, 2006) animalia ornogabeen sistema immunea berezkoa, naturala, ez-espezifikoa, ez-aurretikoa eta ez-klonala da, ornodunekin gertatzen ez den bezala. Animalia hauen jariakin zelomikoak sustantzia kutsagarriak garraiatzen ditu. Bertan solte dauden zelomozitoek (grezieraz, *koilos* hustu; *kytos*, edukiontzi) (2. irudia) zizarea babesten dute sustantzia kutsagarri horien kontra (Lionetto *et al.*, 2012). Tučková eta Bilej-ren arabera (Tučková & Bilej, 1996) zizareek estres baldintzen pean jariakin zelomikoa bere zelomozitoekin kanporatzen dute presio intrazelomikoaren emendioa dela eta. *Eisenia fetida*-ren antzekoa den *Eisenia hortensis* zizareak hiru motatako zelomozitoak dauzka eta hauek ugaztunen leukozitoen antzeko funtzioa betetzen dute, hala nola, fagozitosirako ahalmena (Fuller-Espie, 2010). Alde batetik, kloragozitoak (eleozitoak) autofluoreszentzia duten zelula granularrak dira. Zelula hauek erriboflabina (B2 bitamina) asko metatzen dituzte kloragosometan (Homa *et al.*, 2012). Zelula hauek metalekin esposatzean erriboflabina kontzentrazioak jaisten direla frogatu da (Plytycz *et al.*, 2011). Gainera, eleozitoak jariakin zelomikoaren pH-a konstante mantentzeaz eta glukogenoa eta lipidoak metatzeaz arduratzen dira (Homa *et al.*, 2012). Beste alde batetik, amebozito hialinoak eta granularrak fagozitosia egiten duten zelulak dira eta zelomaren ehun kloragogenikoaren lerro mesenkimatikotik eratortzen dira (Lionetto *et al.*, 2012). Dena den, jariakin zelomikoak heldutasun fase eta funtzionaltasun fase desberdinetan dauden zelulak dituzenez ez da erabateko sailkapen bat lortu (Adamowicz & Wojtaszek, 2001) eta askotan bost zelomozito mota deskribatu dira (Valembos *et al.*, 1985; Jarosz & Gliński, 1997).



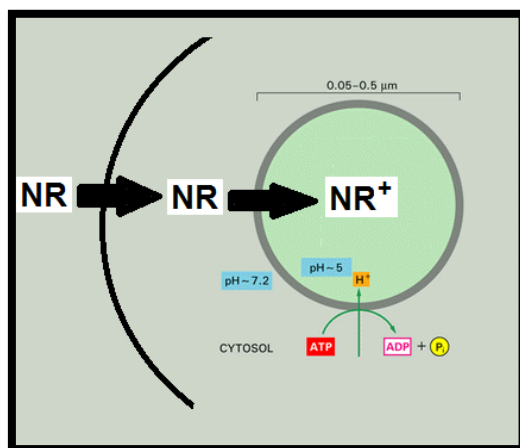
2. **Irudia:** *Eisenia fetida* zizarearen zelomozitoak. Engelmann *et al.*, 2005 artikulutik eraldatuta

Esperimentu gehienak *in vivo* esposaketan oinarritzen diren arren, honako lan hau *in vitro* egin da 3R filosofia jarraituz. Russel & Burch “The principles of humane experimental technique” liburuan esan zuten 1959. urtean (National Centre for the Replacement, Refinement & Reduction of Animals in Research, 2004), esperimentu bat gauzatzeko orduan babestutako animaliak (hala nola, ornodunak heldugabeko formak barne, eta zefalopodoak) ez erabiltzea (“replacement”), ahalik eta animalia gutxien erabiltzea (“reducement”) eta ikerketa batean animalien erabilera ezinbestekoa zenean, animaliarik ahalik eta kalte edo min gutxien eragiten zizkieten prozeduren erabilera (“refinement”) proposatzen zuten. 3R-ak betetzeko, *in vitro* esperimentazioa aipatzen zuten aukera gisa. Izan ere, *in vitro* teknikak erabiltzean medioa kontrolatzea errazagoa da, laginak ondo karakterizatzeko aukera dago eta *in vivo* baino arazo etiko gutxiago sortzen ditu orokorrean zelulekin ikertzen delako eta ez animaliekin. Orain dela gutxi kultibo zelular primarioak erabiltzen hasi dira. Hauek *in vivo* zelulen egoera fisiologikoaren berri ematen dute. Izaki bizidun batetik lortzen dira eta *in vitro* mantentzen dira laborategian (ATCC, 2012). Azken hamarkadetan *in vitro* tekniken aplikazioa indartu da ekotoxikologiako alorrean.

Zelomozitoek xenobiotiko desberdinen aurrean sentikortasuna adierazten dutenez, entsegu ekotoxikologiko desberdinak garatu dira itu-zelula hauetan kutsatzaileek eragiten dituzten kalteak neurtzeko (Irizar, 2013). Biomarkatzaileak organismoetan, ehunetan edo gorputzeko jariakinetan neur daitezkeen eta kutsatzaile bat edo gehiagoren eragina edo esposizioaren ebidentzia ematen duten aldaketa biokimiko, zelular, fisiologiko edo portaerazkoak dira (Depledge, 1994). Huggett eta kideen arabera (Huggett *et al.*, 1992) zenbait irizpide kontutan hartu behar dira biomarkatzaile bat ebaluatzeko orduan: dosi-erantzun erlazioa, sentikortasuna, garrantzi ekologikoa, espezifizitate kimikoa eta denbora-erantzun erlazioa, besteak beste. Gaur egun kutsatzaileen eragina ebaluatzeko lur-zizareen zelomozitoetan erabiltzen diren biomarkatzaileen artean lisosomaren mintzaren egonkortasuna dago (Lionetto *et al.*, 2012).

Kultibo zelularren bideragarritasuna neurtzeko existitzen diren eta gehien erabiltzen diren entseguren artean NRU (Neutral Red Uptake edo Gorri Neutroaren Harrera) eta fagozitosia daude. NRU testa *in vitro* egiten den entsegu zitotoxikoa da, lisosomen eta mintz zelularren egonkortasuna neurtzen duena

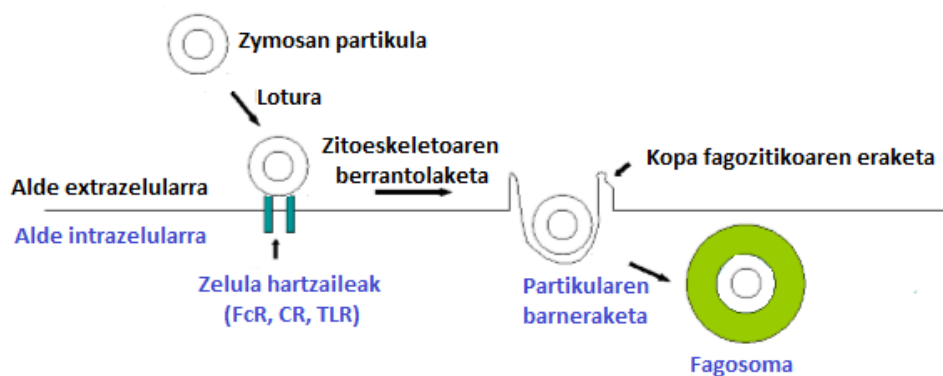
(Svendsen *et al.*, 2004). Neutral Red (NR) edo gorri neutroa tindatzaile kationiko bat da eta zelula biziek NR difusioz (3. irudia) barneratu eta endosoma eta lisosoma bezalako konpartimendu zelular azidoetan metatzeko gaitasuna dute. Lisosomen pH-a azidoa da, 4,8-5, zitostolarekin konparatuz, 7,2, eta pH diferentzia hori mantendu ahal izateko  $H^+$  ioiak mintzean dituen protoi-ponpen bidez barneratzen ditu. Konpartimentu honen pH-a azidoa denez NR protonatzen da ( $NR-H^+$ ) eta harrapatuta geratzen da organuluaren barnean. Lisosomaren mintzaren kaltetuta badago, ordea, protoien galera gertatzen da eta ondorioz, NR tindatzailearen galera (Uribe, 2008; Irizar, 2013).



3. **Irudia:** zelomozitoen lisosometan gertatzen den Neutral Red harreraren eskema. [http://mol-biol4masters.masters.grkraj.org/html/Co\\_and\\_Post\\_Translational\\_Events6-Protein\\_Degradation.htm-tik](http://mol-biol4masters.masters.grkraj.org/html/Co_and_Post_Translational_Events6-Protein_Degradation.htm-tik) eraldatuta.

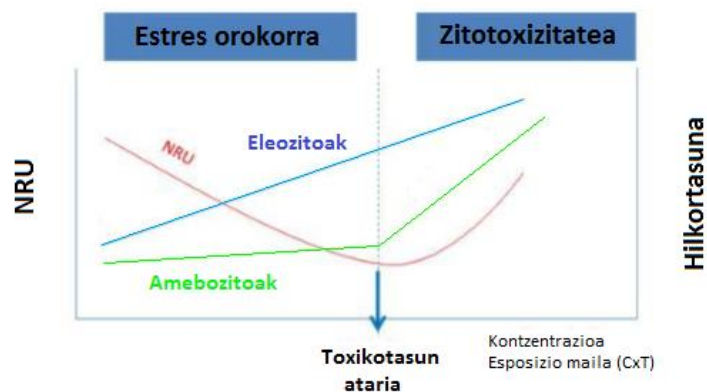
Fagozitosi prozesua oso garrantzitsua da ornogabe gehienentzat agente arrotzen kontra babesteko. Izan ere, fagozitoak edo fagozitosia burutzen duten zelulek zelula hilak edo patogenoak garbitzeaz arduratzen dira. Jariakin zelomikoak faktore immune desberdinak metatzen ditu eta hauetariko batzuk fagozitosia errazten duten opsoninak bezala funtzionatzen dute eta beste batzuk, ordea, molekulen ezagumenduan jarduten dute (Homa *et al.*, 2012). Anelidoetan fagozitosia zenbait faseetan ematen da (Adamowicz & Wojtaszek, 2001) 4. irudian ikusten den bezala. Fagozitoek partikula hauek ezagutzen dituzte eta mintzen fusioa gertatzen da fagosoma bat sortuz (Cell Biolabs, INC, 2007-2013; Fuller-Espie, 2010). Partikularen barneraketa gertatzeko zitoeskeletoaren berrantolaketan laguntzen duten seinalizazio bidezidorren aktibazioa eman behar da. Fagosoma hori lisosoma batekin fusionatzen da fagolisosoma bat eratuz eta bertan partikula horiek suntsituko dira pH azidoa, hidrolisia eta molekula erradikalen eraso dela eta. Fagozitosia aztertzeko erabiltzen diren testetan askotan Zymosan partikulak erabiltzen dira (Cell Biolabs, INC, 2007-2013). *Saccharomyces cerevisiae* legamiaren paretaren zelularretik lortzen da eta proteina-karbohidrato konplexuak dira.





4. **Irudia:** Zymosan partikulen fagozitosi-prozesua (Cell Biolabs, INC, 2007-2013 protokolutik eraldatuta).

Zenbait ikerlariak erakutsi dute zelomozitoek estres baten pean zeudenean (5. irudia) eleozitoen hilkortasuna emendatzen zela eta ondorioz, Gorri Neutroaren harrera txikitzen zela. Estres mailak emendatzen direnean, ordea, amebozitoek hildako eleozitoak fagozitatzen dituzte (eta horiekin batera eleozitoak fagozitatutako Gorri Neutroa) eta hori dela eta toxikotasun atalase batetik gora NRU-aren emendioa ikusten da, amebozitoek eleozitoak barneratzeaz batera beraietan dagoen tindatzailea ere barneratzen dutelako. Estresa oraindik ere handiagoa denean (zitotoxizitatea) amebozitoak ere hiltzen dira berriz ere NRU-ren mailak jaitsiz. Beraz, NRU testari dagokionez, erantzun bimodal bat ikusi da estrespean mantendutako zizareetan (Irizar, 2013).



5. **Irudia:** NRU-aren erantzun bimodala (lerro gorria) eta zelomozitoen azpipopulazioen (eleozitoak urdinez eta amebozitoak berdez) hilkortasunaren eskema. Irizar, 2013 doktorego tesitik eraldatuta.

NRU bezalako teknika batean, zelulak zizareetatik erauzi eta gero pH neutroan mantentzen dira entsegua egiteko, baina aldez aurretik aipatu dugun moduan, baldin eta metalaren presentziak lurzuruetako pH-arengan eragina badauka, pH-aren aldaketa horrek zelularen erantzunkortasunean edukiko lukeen eragina aztertzea komenigarria izango litzateke, eta erantzun bimodala mantentzen den ere aztertzea etorkizuneko ikerketarako ere interesgarria izango litzateke.

Beste alde batetik, zelula mantentzeko egun merkatuan dauden hainbat hazkuntza medioen eragina ere aztertzea interesgarria dela uste dugu. Honela, Eagle media eta Leibovitz L-15 media erabili eta konparatu izan dira fagozitosiaren esperimentuan. L-15 media CO<sub>2</sub> gabeko inkubazioak burutzeko prestatzen den media da. Glukosa eduki beharrean galaktosa dauka, pH fisiologikoa mantentzeko. Gainera, sodio bikarbonatoa izan beharrean fosfatoak eta aminoazido basikoak dauzka. Eagle media soilik ezinbestekoak diren aminoazidoak dauzka.

## **2. PLANTEATUTAKO HIPOTESIA ETA LANAREN HELBURUA**

Lurzoruetan metalak metatzen direnean zizareetan estres handia eragiten dute, eta estres mailak neurtzeko NRU bezalako teknika erabiltzen da. Honekin batera metalen presentziak pH-aren jaitsiera bat eragiten du. Beraz, metalaren presentziaz gain, pH jaitsiera horrek bakarrik bere kabuz (metalaren presentziarik gabe) NRU-rengan duen eragina neurtzea da lan honen lehendabiziko helburua.

Beste alde batetik, toxikotasun testetan behatu da estres egoeretan zelomozitoen fagozitosi ahalmena handitzen dela eta zelulen proportzioen aldaketekin (amebozito eta eleozitoen azpipopulazioekin) erlazionatu da. Ikerketa honen bigarren helburua zelomozitoak kadmioaren kontzentrazio zitotoxikoekin tratatzean, duten fagozitosi ahalmena behatzea da.

Azkenik, lanaren hirugarren helburua bi hazkuntza mediok (L-15 eta Eagle) zizareen zelomozitoen fagozitosi ahalmenean duten eragina aztertzea da.

### **3. MATERIALAK ETA METODOAK**

#### **3.1. ZIZAREAK**

*Eisenia fetida* (Savigny, 1826) zizare helduak (300-600g eta klitelodunak, (OECD, 1984) erabili ziren laborategiko stock-etik hartuak. Zizare hauek ingurune kontrolatuan mantendu ziren erabili arte, 19°C-tan, ilunpean, hezetasunean eta zaldi gorotzekin elikaturik. Esperimentua hasi baino 24 ordu lehenago zizareak depuratzen jarri ziren 24 orduz iragazki paper hezean. Horren ostean, hestean geratutako lurzoru arrastoak eta gorotzak kendu ziren zizarearen atzeko partean masajeatuz.

#### **3.2. ZELOMOZITOEN ERAUZKETA**

Zizareak erauzketa soluzioa (PBS-0.1 M Na-fosfato tanpoia, %0.2 EDTA, pH 7.2-7.4; 1 ml zizare bakoitzeko) zuen beirazko Petri kutxa batetan jarri eta 9V-tako korrante elektrikoa aplikatu zitzaizen zelomozitoak gorputzeko poro dortsaletatik kanporatu zitzaizen (3 segundotako 10 txanda), likidoa ugerra ikusi arte (Plytycz, *et al.*, 2006 prozeduraren moldapena).

Zelomozitoak zituen erauzketa-likidoa Falcon hodietan jarri eta 10-15 minutuz zentrifugatu ziren 1000 rpm-tan eta 4°C-tan (*Allegra™ 25R Centrifuge Beckman Coulter*) jariakin zelomikoetan zeuden zelulak prezipitatzeko. Fluxu kanpian Falcon hodietan geratzen zen gainjalkina kendu eta zelulak garbiketa disoluzioan (PBS, %1 penizilina/ estreptomizina, %1 anfoterizina, %0.5 gentamizina, pH 7.4) berresekitu ziren (1ml zizare bakoitzeko). Zelulak berriz zentrifugatu ziren, lehen aipatutako baldintzetan, lagina gutziz garbitzeko. Gainjalkina kendu eta kultibo medioan (13.8 g/L Leibovitz L-15, 0.281g/L CaCl<sub>2</sub> anhidrido, %1 penizilina/ estreptomizina, %1 anfoterizina, %0.5 gentamizina, pH 7.4) berresekitu zen.

L-15 kultibo medioa NR entsegurako erabiltzeaz gain, bi hazkuntza medio desberdinetan zelomozitoak erakusten zuten fagozitosi ahalmena konparatu nahi zenez, fagozitosi entsegua egiteko zelomozito pool bat erabili zen eta zelomozitoen erauzketa eta zentrifugazio bidezko garbiketak egin ostean, zelomozitoen gainjalkina L-15 eta Eagle hazkuntza medioetan berresekitu ziren.

Azkenik, 96 mikroputzuetako plaka batetan 200µl zelomozito esekidura jarri zen putzu bakoitzeko, bakoitzean zelula kopurua gutxi gora-behera 200.000-koa izateko (Irizar, 2013). Zelomozitoen garbiketa eta hazkuntza *Cultair BC 100 Cultek* fluxu laminarreko kanpian burutu zen asepsia baldintzak ziurtatzeko. Zelulak 24 orduz jarri ziren inkubatzen ilunpean CO<sub>2</sub> gabeko inkubagailu batean (*Sanyo Incubator*).

#### **3.3. ZELOMOZITOEN ESPOSIZIOA pH DESBERDINETARA (NRU TESTA) ETA KADMIO ETA METIL MERKURIORA (FAGOZITOSI FROGA)**

NR entsegurako, kultibo medioa (13.8 g/l Leibovitz L-15; %1 Penizilina/ Estreptomizina; %1 Anfoterizina; %0.5 Gentamizina; pH 7.4) prestatu, Falcon hodi desberdinetan banatu, azido klorhidrikoarekin (HCl) eta sodio hidroxidoarekin (NaOH) medioaren pH-a aldatu zen eta pH-metroa erabiliz pH desberdinetan jarri ziren, pH 2; 4; 4.5; 5; 5.5; 6; 6.5; 7; 7.5; 8; 8.5; 9 zuten kultibo medioak eskuratu arte. Fluxu kanpai barnean, medioak 20µm-tako teflon filtroetatik pasarazi ziren.

Aurreko egunetik inkubatzen zegoen 96 mikroputzuetako plaka zentrifugatzen jarri zen 10 minutu 100rpm-tan eta 4°C-tan. Mikroputzuak zuten medioa ponpa batekin xurgatu eta pH desberdinetako medioa gehitu zitzaien, 200µl. Bost erreplika egin ziren pH bakoitzeko eta beste bost erreplika kontrol gisa erabili ziren

Fagozitosiaren entsegurako, aurreko egunetik inkubatzen zegoen plakaren hazkuntza medio bakoitzeko bost erreplikei 2µl metil merkurio ( $\text{CH}_3\text{HgCl}$ , 205µg/ml kontzentrazioan), beste bost erreplikei 2µl Kadmio gehitu zitzaien Kadmio kloruro moduan ( $\text{CdCl}_2$ , 5µg/ml kontzentrazioan) eta beste bost erreplika kontrol gisa mantendu ziren.

Azkenik, 96 mikroputzuetako plakak 24 orduz inkubatzera sartu ziren ilunpean  $\text{CO}_2$  gabeko inkubagailuan.

### **3.4. NEUTRAL RED UPTAKE (NRU) TESTA**

24 ordu inkubatzen zegoen 96 mikroputzuetako plaka zentrifugatu zen (1000rpm, 19°C eta 10 minutu) eta medioa xurgatu zitzaion ponpa baten laguntzaz. Mikroputzu bakoitzean 200µl NR soluzioa (PBS, %10 NR stock, 0.04g NR hauts 100ml uretan disolbatuz) gehitu zen, 5 erreplika kontrol gisa erabiliz. Inkubatzera sartu zen 30 minutuz. Putzu bakoitzean 200µl PBS gehitu ziren. Ondoren PBS xurgatu zen eta putzu bakoitzean erauzketa soluzioaren (%29 alkohol absolutu, %1 azido azetiko eta %70 ur destilatatu) 100µl gehitu ziren putzu bakoitzean. Erauzketa soluzioa zelulen barneko NR kanporatzeko erabili zen. 10 minutu pasa ostean, NRU testaren absorbantzia balioak 540nm-tan neurtu ziren mikroplakak irakurtzen zituen *Multiskan Spektrum Thermo Scientific* espektrofotometroan.

### **3.5. FAGOZITOSIA**

#### **3.5.1. NR-az tindatutako Zymosan partikulen prestaketa**

10mg Zymosan ur desionizatuko 100 ml-tan disolbatu zen eta 15 minutuz nahastu zen. Ondoren, 4°C-tan eta 5 minutuz zentrifugatu zen 300rpm-ko abiadurarekin. “Pellet”-ari ur desionizaturia gehitu zitzaion (15ml). Berriz zentrifugatu zen aurreko baldintza berdinetan. “Pellet”-a 100ml TBS-tan (6.06g Tris, 8.76g NaCl, 1M HCl, ioi gabeko ura) disolbatu zen. Hirugarren aldiz zentrifugatu zen. “Pellet”-a 10ml NR-tan disolbatu zen. Nahastu eta bainu termostatikoko batean 15 minutuz eta 65°C-tan jarri zen.

Hozten utzi zen eta ondoren 300rpm-tan, 4°C-tan eta 5 minutuz jarri zen zentrifugatzen. “Pellet”-a 10ml %1.8 azido fosfomolibdikoan disolbatu zen eta ondoren 4°C-tan jarri zen lagina 30 minutuz. Berriz zentrifugatu zen baldintza berdinetan. “Pellet”-ari 10ml ioi gabeko ur gehitu zitzaizkion eta berriz zentrifugatu zen. “Pellet”-a 20ml %6 amonio heptamolibdatoan disolbatu zen. Lagina 30 minutuz 4°Ctan jarri zen eta berriz zentrifugatu zen. “Pellet”-a 20ml TBS-tan disolbatu zen.

Azken pausua, “Pellet” hori NR soluzioarekin (PBS, %10 NR stock, 0.04g Neutral Red hauts 100ml uretan disolbatuz) nahastea izan zen.

### **3.5.2. Zelomozitoen esposaketa NR-az tindatutako Zymosan partikulei**

Aurreko egunetik inkubatzen zegoen 96 putzuetako plaka atera zen eta putzu bakoitzetik 2µl kultibo medio xurgatu ziren ponpa baten laguntzaz. Ondoren, aurretik prestatutako NR tindatzailearekin tindatutako Zymosan partikulen 2µl gehitu ziren eta 30 minutu utzi ziren inkubatzen. Fagozitosi testaren absorbantzia balioak 540nm-tan neurtu ziren mikroplakak irakurtzen zituen *Multiskan Spektrum Thermo Scientific* espektrofotometroan.

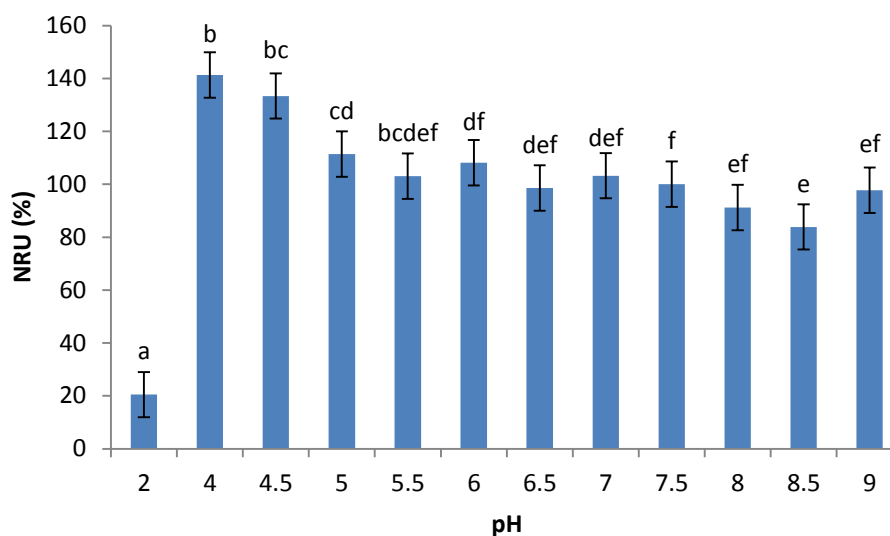
## **3.6. ANALISI ESTADISTIKOA**

Bi esperimenduetan lortutako datuak tratatzeko SPSS 17.0 software estatistikoa (SPSS Inc., Microsoft Co. 19 version) erabili zen. Analisia Mann Whitney U-test ez-parametrikoren bidez egin zen. Esangarritasun maila  $p < 0.05$ -an finkatu zen.

## 4. EMAITZAK

### 4.1. NRU TESTA

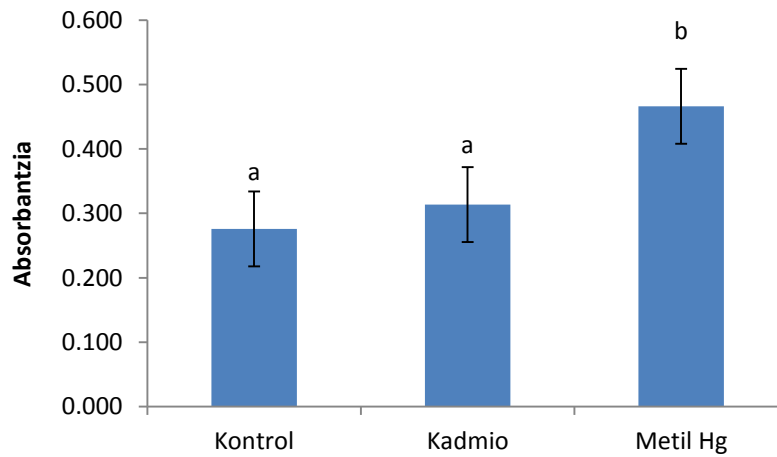
*Eisenia fetida* zizareetatik erauzitako zelomozitoak pH desberdinetara esposatzean (5. irudia) pH neutrotik urrunduz goazen heinean jaitsiera bat ikusi da, baina pH 5; 4.5 eta 4-an absorbantziaren igoera bat ikusten da pH 4-an esangarria izanik. pH horretan, baliorik altuena lortu da, NR barneraketa % 141.27-koa izanik. Oso pH azidoetara esposatzean (pH 2) NR-aren metaketa oso baxua (%20.5) ikusi zen gainontzeko pH-ekin konparatuz.



6. **Irudia:** NRU (%) batezbesteko balioak ( $\pm$  Desbiazio Estandarra (D.E.)) pH desberdinetan. Balioak pH 7.5-aren arabera banatzen dira, zeinaren balioa % 100 den. Letra desberdinek balioak esangarriki desberdinak direla ( $P < 0.05$ ) adierazten dute Mann Whitney U-testaren arabera. Letra berdinak dituzten balioek estatistikoki berdinak dira.

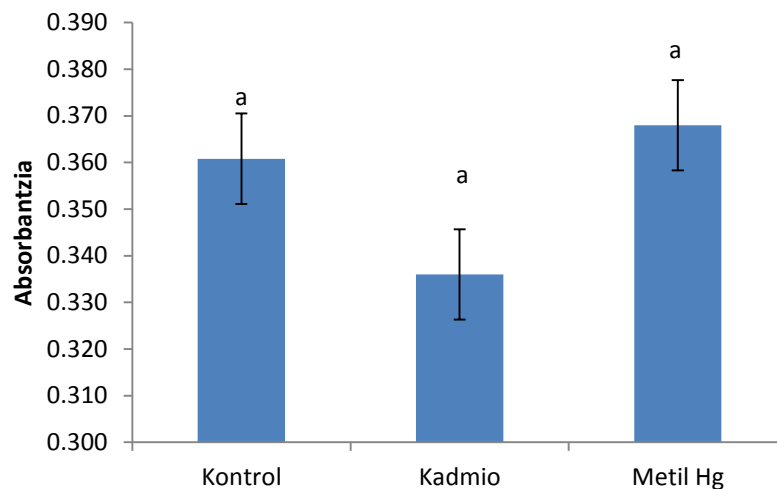
### 4.2. FAGOZITOSIA

*Eisenia fetida* zizaretik erauzitako zelomozitoak Zymosan partikulei esposatu ostean (6. irudia), absorbantzia balorerik baxuena kontrolean behatu zen L-15 medioa erabilia. Lagina metil merkurioarekin tratatu zenean 0.466-ko absorbantzia lortu egin zen eta Kadmio tratamenduarekiko eta kontrolarekiko esangarriki desberdina izanik. Kadmioarekin tratatutako lagina osterako kontrol (0.276) eta metil merkurioarekin tratatukoaren tarteko balioak eman zituen (0.314).



7. **Irudia:** L-15 medioa erabilia batezbesteko balioak ( $\pm$ D.E.). Letra desberdinek balioak esangarriki desberdinak direla ( $P < 0.05$ ) adierazten dute Mann Whitney U-testaren arabera. Letra berdinak dituzten balioek estatistikoki berdinak dira.

Zelomozitoak Eagle medioan kultibatu zirenean (7. irudia), oster, kontrol (0.361), metil merkurioarekin tratatutako lagin (0.368) eta kadmioarekin tratatutako laginen (0.336) artean ez ziren desberdintasun esangarriak behatu, %95 konfiantzarekin.



8. **Irudia:** Eagle medioa erabilia batezbesteko balioak ( $\pm$ D.E.). Letra desberdinek balioak esangarriki desberdinak direla ( $P < 0.05$ ) adierazten dute Mann Whitney U-testaren arabera. Letra berdinak dituzten balioek estatistikoki berdinak dira.

Bestalde, L-15 eta Eagle medioen artean desberdintasun esangarriak zeuden egiaztatzeko (2. taula), estatistika aplikatu zen. Bakarrik kontrolaren kasuan bi medioak esangarriki berdinak izan ziren.



2. **Taula.** L-15 eta Eagle medioen arteko konparaketa Mann-Whitney U-test ez-parametrikoren bidez.  
( $p < 0.05$ )

	Berdinak izateko probabilitatea
L-15 Kadmio – Kadmio Eagle	0.016
L-15 Metil Hg – Metil Hg Eagle	0.008
L-15 kontrola - kontrola Eagle	1.000

## 5. EZTABAIDA

Gaur egun lurzoruen ekotoxikologiaren inguruko ikerketetan gero eta erabiliago izaten ari da zizareen zelomozitoen lisosomaren mintzaren egonkortasunaren ebaluazioa, izan ere, estres orokorraren biomarkatzaile fidagarri gisa kontsideratzen da hainbat ikerketen arabera (Maboeta *et al.*, 2002; Svendsen *et al.*, 2004). Beste biomarkatzaile asko aurkitu izan dira azkenaldian *Eisenia fetida* zizarean erabili daitezkeenak lurzoruaren egoera ebaluatzeko. Biomarkatzaile hauetan gertatzen diren aldaketak asaldura gertatu eta zenbait ordu geroago identifikatu daitezke (Irizar, 2013). Lurzoruen kutsadura maila aztertzeko, lur-zizareak askotan kutsatutako lurretan zuzenean esposatu egin dira zenbait egunez eta ondoren zelomozitoak erauzi dira NR entsegua egiteko, hots, *in vivo* esperimentuak (Hønsi *et al.*, 2002; Asensio *et al.*, 2013). Homa eta kideek (Homa *et al.*, 2012) konturatu ziren *Eisenia andrei* (Bouché, 1972) immuno-estimulatzailerik *in vivo* esposatzean zelomozito kopuru totala murrizten zela eta horrek proliferazio zelularra zekarrela baina ez zekiten murrizpen hori zergatik gertatzen zen: barrunbean zelomozitoak agregatzen zirelako edo zizareak immuno-estimulatzailerik esposatzean kanporatzen zituelako. Esperimentu hau *in vitro* errepikatuko balitz, benetan zelomozitoak poroetatik kanporatzen dituzten ala ez egiaztatuko litzateke.

Beste alde batetik, ikertzaile askok lurzoruan dauden eta zizareen gorputzean metatzen diren metal desberdinen eragina aztertu dute, baina metalek pH-arengan duten eragina kontutan hartuta ikerlan gutxi ikertu dute pH desberdinen aurrean zelomozitoek aurkeztzen duten erantzuna. Esperimentu honetan pH-aren eragin hau aztertu zen NR metodo merkea eta eraginkorra erabiliz. Gorri neutroaren metodoa lurzoruaren egoeran gertatzen diren aldaketak ebaluatzeko gomendatu dute (Hankard *et al.*, 2004; Uribe, 2008). Lan honetan kultibo zelularreko pH-aren aldaketak NR harreraren duen eragina aztertu da. Esperimentua hasi baino lehen, absorbantzia-balio baxuenak muturreko pH-tan espero ziren. Izan ere, zelomozito osasuntsuen lisosomak Neutral Red tindatzailea lisosomen barnean mantentzeko gaitasuna izango dute eta ordea, muturreko pH pean jarritako zelomozito kaltetuek mintz lisosomikoa kaltetuta izango lukete eta ondorioz, gorri neutroa lisosoma barnean mantentzeko arazo gehiago edukiko lituzkete.

*Eisenia fetida*-ren zelomozitoak *in vitro* pH desberdinetara esposatzean eta NR entsegua egitean, erantzun bimodal bat behatu da, hasiera batean dosi menpeko jaitsiera bat erakutsiz eta pH 5.5 izatean eta azidifikatzean igoera bat aurkeztuz. Irizar eta kideek (Irizar *et al.*, bidalita) baita erantzun bimodala behatu zuten *Eisenia fetida*-ren zelomozitoak kobrera, kadmiora, berunera eta nikelera esposatu zituztenean. Dosi menpeko NRU jaitsiera behatu zuten non eta kadmio eta kobreakin kontzentrazio txikietan jaitsiera bat ikusi zuten eta dosi altuagoetan berriro ere absorbantziaren igoera hori ematen zen. Beste alde batetik, Asensio eta kideek (Asensio *et al.*, 2013) zizareak *in vivo* lurzoru desberdinetara esposatzean NR harreraren murrizpena behatu zuten, metal gehien zituen lurtean egon ziren zizareen zelomozitoena txikiena izanik.

NR harrera zelomozitoek lisosometan metatzen duten NR kantitatea neurtzen badu ere, gorri neutroaren erretentzio (NRR)-denbora NR lisosomen barnean meta dezaketen denbora neurtzen du eta zenbait ikerketetan frogatu da lisosomaren mintza zenbat eta kaltetuagoa egon, tindatzailea arinago galtzen dela

dosi menpeko NRR-denbora txikipena lortuz (Hønsi *et al.*, 2003). Gainera, Rocco eta kideek (Rocco *et al.*, 2011) *Eisenia fetida* zizarea kobreaki esposatu zuten *in vivo* eta metalen depurazio fasean (esposatu osteko 14. egunetik aurrera) zehar konturatu ziren kobre kontzentrazioaren beherakada mintz lisosomikoaren konponketa baino azkarrago ematen zela honek dakarren NRR denboren emendio gradualarekin. Beraien ustez, kaltetutako zelomozitoen ordezkatzeko mailakatu ematen zen zelula berriekin kaltetutako zelula zaharrak ordezkatzeko zituztelarik. Hipotesi hau egiazkoa bada gure emaitzekin bat etorriko litzateke. Izan ere, baliteke azidotetasun puntu batetik aurrera, zelomozitoen proliferazioa indusitzea eta indukzio hori dela eta, zelomozito berrien presentziak espektrofotometroko neurtzen duen absorbantziaren gaineragina edukiko luke eta beraz absorbantzia altuagoak lortuko ziren, hots, zelomozito guztien artean zegoen Neutral Red kopurua handiagoa delako. Hala ere, *in vitro*-n proliferazio hori bakarrik eman zitekeen zelomozitoen zatiketa zelularra 24 ordutan emango balitz, izan ere, soilik 24 orduz inkubatu zuten dira zelomozitoak eta nahiz eta zelula hauen proliferazio ahalmena zein den ezagutu ez da zaila pentsatzea hori gertatzen dela. Zelomozitoen proliferazioa gertatzen dela frogatzeko entsegu paralelo bat egitea gomendatzen da, non zatiketa zelularra pairatzen ari diren zelulak markatu eta kuantifikatu daitezkeen. BrdU (Bromodeoxiuridina) da markatzaile horietako bat eta teknika immunofluoreszenteak erabiliz eta, fluxu zitometria edo fluoreszentsiazko mikroskopia optikoaren bidez erraz zehaztu eta frogatu daiteke estres egoeran zelulen berriztapena emendatzen den edo ez. (Irizar, 2013; Zaldibar *et al.*, 2007). Kasu honetan, zentsu gehiago zeukan pentsatzeak, pH atalase bat pasatu ostean, pH zitotoxiko batera heltzen dela eta beraz, sentikortasun handiagoa duten eleozitoak hiltzen hasten direla. Egonkorragoak diren amebozitoek tindatzailea barnean duten eta hilda dauden eleozitoak fagozitatzen hasten dira eta horrek azalduko luke NRU seinalearen igoera.

Beste alde batetik frogatu nahi izan da Zymosan partikulak fagozitatzeke zelomozitoek erakusten duten ahalmena kadmio bezalako metalen pean inkubatu direnean. Kadmioak lisosomen mintzean kalteak eragiten dituela deskribatu da (Asensio *et al.*, 2013) eta beraz, zelomozitoen pH-arekin gertatu bezala zizareen sistema immuneko zelulen azpipopulazioek sentikortasun desberdina erakusten bazuten, amebozitoak eleozitoak fagozitatuko zituzten eta ondorioz, espektrofotometroarekin neurtzean kontrola baino seinale altuagoa espero zen. Kadmioarekin tratatutako zelulek kontrolkoen fagozitosi maila berdina erakutsi zituzten, erantzun hau, agian erabilitako kadmio kontzentrazioa txikiegia zelako eleozitoen heriotza eta amebozitoen fagozitosia bultzatzeko edo akats metodologikoren bat egon zelako. Metil merkurioarekin tratatutako zelomozitoak kontrol positibo gisa erabili ziren eta konposatu honen pean jarritako zelomozitoetan seinale altua espero zen eta horrela gertatu da. Beraz, kasu honetan esan daiteke eleozitoak hil direla eta amebozitoen hildako zelulak fagozitatzen hasi direla, beraz, beraien fagozitosi ahalmen basala emendatua dago, Kadmioarekin gertatu ez bezala. Gliński eta Jarosz (Jarosz & Gliński, 1997) behatu zuten *Eisenia fetida*-ren eleozitoak ez zutela fagozitosi ahalmenik eta zelomozito mota guztietan ahalmen hori denborarekin handitzen zihoala. Beraz, proposatzen dugu hurrengo esperimenduetan kadmio eta metil merkurio dosi zabalagoak erabiltzea eragina aztertzeke eta baita esposizio denbora luzeagoak erabiltzea.

Bi medioen arteko konparaketa burutu zenean eta estatistika aplikatu zenean bi medioen artean desberdintasun esangarria zegoela ikusi zen metil Hg eta kadmioaren kasuan. Beraz, esan daiteke

zelomozitoen kultiborako erabiltzen den medio mota garrantzia duela erakusten duten fagozitosi ahalmenean eta medio hauen erabilpena kontutan hartu beharko da etorkizunetako lanetan.

## 6. ONDORIOAK

pH desberdinen esposizioaren entseguak adierazten digu pH-ak bere kabuz eragina duela NRU aldaketan eta azidotasunaren handipenak lisosomen mintzaren egonkortasunarekin erlazioa duela. Azidotasun puntu batetik aurrera ( $\text{pH} \leq 5.5$ ) amebozitoak eleozitoak fagozitatzen hasten dira eta horrek azal dezake absorbantziaren igoera.

Hazkuntza medioak zelomozitoak duten fagozitosi ahalmena baldintzatu dezake. Oraindik ez dago argi esperimentu honetan erabili den baino kadmio kontzentrazio handiago batek eragina izan dezakeen zelomozitoen fagozitosian eta etorkizunerako kadmio eta metil merkurioaren kontzentrazio zabalagoak erabiltzea proposatzen da.

## **7. ESKER ONAK**

Ikerketa hau Zientzia eta Teknologia fakultatearen (Euskal Herriko Unibertsitatea) Zoologia eta Animalia Zelulen Biologiako departamentuaren laborategietan gauzatu zen Amaia Irizar eta Beñat Zaldibar (Gratu Amaierako Lanaren tutorea) laguntzarekin.

## 8. BIBLIOGRAFIA

- Adamowicz, A. & Wojtaszek, J., 2001. *Morphology and phagocytotic activity of coelomocytes in Dendrobaena veneta (Lumbricidae)*. Zoologica Polonica, 46/1-4, 91-104 orrialdeak.
- Antonello, S.D., 2007. *Frontiers in Ecology Research*. New York: Nova Science Publishers.
- Asensio, V., Rodríguez-Ruiz, A., Garmendia, L., Andre, J. & Kille, P., 2013. *Towards an integrative soil health assessment: a three tier (integrative biomarker response) approach with Eisenia fetida applied to soils subjected to chronic metal pollution*. Science of the total Environment, No. 442, 344-365 orrialdeak.
- ATCC, 2012. *ATCC® primary cell culture guide: tips and techniques for culturing primary cells*.
- Buratti, S., Ramos-Gómez, J., Fabbri, E., DelValls, T.A., Martín Díaz, M.L., 2011. *Application of neutral red retention assay to caged clams (Ruditapes decussatus) and crabs (Carcinus maenas) in the assessment of dredged material*. Ecotoxicology, No 21, 75-86 orrialdeak.
- Cell Biolabs, INC, 2007-2013. *CytoSelect™ 96-Well Phagocytosis Assay (Zymosan Substrate)*.
- Center for Integrated Pest Management, 2003. *Pesticide usage in the United States: Trends During the 20<sup>th</sup> Century*. CIPM Technical Bulletin 105.
- Cooper E.L., 2006. *Comparative immunology*. Invertebrate Zoology, Vol 1, 32-43 orrialdeak.
- Depledge, M.H., 1994. *The rational basis for the use of biomarkers as ecotoxicological tools. Nondestructive Biomarkers in Vertebrates* liburuan, Fossi, M.C. & Leonzio C., 1994. CRC Press. 368 orrialde.
- Donker, M.H., Eijsackers, H., Heimbach F., 1993. *Ecotoxicology of Soil Organisms*. CRC Press. 496 orrialde.
- Engelmann, P., Palinka, L., Cooper, E.L., Nemeth, P., 2005. *Monoclonal antibodies identify four distinct annelid leucocyte markers*. Developmental and Cooperative Immunology, No. 29, 599-614 orrialdeak.
- Fuller-Espie, S.L., 2010. *Using Flow Cytometry to Measure Phagocytic Uptake in Earthworms*. Journal of Microbiology & Biology Education, Vol. 11, No. 1, 144-151 orrialdeak.

- Hankard, P.K., Svendsen, C., Wright, J., Wienberg, C., Fishwick, S.K., Spurgeon, D.J. & Weeks, J.M., 2004. *Biological assessment of contaminated land using earthworm biomarkers in support of chemical analysis*. Science of the Total Environment. 330 (1-3): 9-20 orrialdeak.
- Homa, J., Zorska, A., Wesolowski, D., Chadzinska, M., 2012. *Dermal exposure to immunostimulants induces changes in activity and proliferation of coelomocytes of Eisenia Andrei*. Journal of Comparative Physiology B (2013) 183, 313-322 orrialdeak.
- Hønsi, T.G., Stubberud, H.E., Andersen, S. & Stenersen, J., 2002. *Lysosomal fragility in earthworms (Eisenia veneta) exposed to heavy metal contaminated soils from two abandoned pyrite ore mines in southern Norway*. Water, air and soil pollution, No. 142, 27-37 orrialdeak.
- Huggett, R.J., Kimerle, R.A., Mehrle Jr., P.M., Bergman, H.L., Dickson, K.L., Fava, J.A., McCarthy, J.F., Parrish, R., Dorn, P.B., McFarland, V. & Lahvis, G., 1992. *Introduction*. Huggett, R.J., Kimerle, R.A., Mehrle Jr., P.M., Bergman, H.L.. *Biomarkers: Biochemical, Physiological, and Histological Markers of Anthropogenic Stress* liburuan. Lewis, 347 orrialde.
- Institute for Advanced Sustainability Studies, 2013. *Soil contamination*. Global Soil Forum. 6 orrialde.
- Irizar, A., 2013. *Soil health assessment through in vitro assays with primary cultures of coelomocytes of Eisenia fetida*. Doktorego tesia. 256 orrialde.
- Irizar, A., Rivas, C., Olivares, S., Goñi de Cerio, F., Etxeberria, J., Marigómez, I. & Soto, M. (bidalita). *Toxicity treshold in coelomocytes of Eisenia fetida: implications for toxicity biomarker measurement*.
- Jarosz, J. & Gliński, Z., 1997. *Earthworm immune response*. Folia Biol., 45, 1-9 orrialdeak.
- Lionetto, M.G., Calisi, A. & Schettino, T., 2012. *Earthworm Biomarkers as Tools for Soil Pollution Assessment*. Soil Health and Land Use Management, No. 16, 305-332 orrialdeak.
- Ma, W., Edelman, T., Van Beersum, I. & Jans, T., 1983. *Uptake of cadmium, zinc, lead and cooper by earthworms near a zinc-smelting complex-influence of soil pH and organic matter*. Bull. Environ. Contam. Toxicol. No. 30, 424-427 orrialdeak
- Maboeta, M.S., Reinecke, S.A. & Reinecke, A.J., 2002. *The relationship between lysosomal biomarker and population responses in a field population of Microchaetus sp. (Oligochaeta) exposed to the fungicide copper oxychloride*. Ecotoxicology and Environmental Safety. Vol. 52, No.3, 280-287 orrialdeak.



- National Atmospheric Deposition Program (NADP), 1999. *National Atmospheric Deposition Program 1999 Annual Summary*. 16 orrialdeak.
- National Centre for the Replacement, Refinement & Reduction of Animals in Research, 2004. (<http://www.nc3rs.org.uk/>) (kontsulta-data: 14/05/04)
- OECD, 1984. *Guideline: earthworms acute toxicity test*. No. 207, Paris, France.
- Plytycz, B., Homa, J., Koziol, B., Rozanowska, M., Morgan, A.J., 2006. *Riboflavin content in autofluorescent earthworm coelomocytes is species-specific*. *Folia Histochem Cytobiol.*, No. 44, 275–280 orrialdeak.
- Plytycz, B., Cygal, M., Lis-Molenda, U., Klimek, M., Mazur, A.I., Duchnowski, M. & Morgan, A.J., 2011. *Characteristics of immune-competent amoebocytes non-invasively retrieved from populations of the sentinel earthworm Lumbricus rubellus (Annelida; Oligochaeta; Lumbricidae) inhabiting metal polluted field soils*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 74, 719-726 orrialdeak.
- Rocco, A., Scott-Fordsmand, J.J., Maisto, G., Manzo, S., Salluzzo, A. & Jensen, J., 2011. *Suitability of lysosomal membrane stability in Eisenia fetida as biomarker of soil copper contamination*. *Ecotoxicology and environmental safety*, No. 74, 984-988 orrialdeak.
- Russel, W.M.S. & Burch, R.L., 1959. *The principles of humane experimental technique*. Methuen.
- Svendsen, C., Spurgeon, D.J., P.K. & Weeks, J.M., 2004. *A review of lysosomal membrane stability measured by neutral red retention: is it a workable earthworm biomarker?*. *Ecotoxicology eta environmental safety* 57, 20-29 orrialdeak.
- Tučková, L., Bilej, M., 1996. *Mechanism of antigen processing in invertebrates: are there receptors?*. Cooper, E.L., ed., *Comparative and Environmental Physiology*. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 41-72 orrialdeak.
- Uribe R., 2008. *Ensayo de citotoxicidad aguda con celomocitos de la lombriz de tierra Eisenia foetida*. Patricia Ramírez Romero eta Ana Mendoza Cantú. *Ensayos toxicológicos para la evaluación de sustancias químicas en agua y suelo*. Instituto Nacional de Ecología.
- Valembois, P., Lassegues, M., Roch, P. & Vaillier, J., 1985. *Scanning electron microscopic study the involvement of coelomic cells in earthworm antibacterial defence*. *Cell and Tissue Research*, Vol. 240, No. 2, 479-484 orrialdeak.

- Vijver, M.G., Vink, J.P.M., Miermans, C.J.H. & Van Gestel, C.A.M. (2003). *Oral sealing using glue: a new method to distinguish between intestinal and dermal uptake of metals in earthworms*. *Soil Biology and Biochemistry*, Vol. 35, No. 1, (January 2003), 125-132 orrialdeak.
- Ware, G., 2006. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*. United States of America: Springer. Vol. 188
- Zaldibar B, Cancio I, Marigómez I. 2007. *Reversible alterations in epithelial cell turnover in digestive gland of winkles (Littorina littorea) exposed to cadmium and their implications for biomarker measurements*. *Aquat Toxicol* 81, 183-96 orrialdeak.