

Gradu Amaierako Lana
Biokimika eta Biologia Molekularreko Gradua

Tetraziklinaren eraginaren azterketa *Eisenia fetida* zizarean zelula- eta ehun-mailako biomarkatzaileak erabiliz

Egilea:
Ane Arrizabalaga Iriondo

Zuzendaria:
Beñat Zaldibar Aranburu

© 2022, Ane Arrizabalaga Iriondo

AURKIBIDEA

1. SARRERA	3
1.1. Antibiotikoen eragindako ingurumen-kutsadura eta osasun-kaltea	3
1.2. Tetraziklinaren ezaugarriak eta eragina osasunean zein ingurumenean.....	4
1.3. Lur-zizareak lurzoruaren toxizitatea neurtzeko organismo modelo gisa.....	5
2. HELBURUAK	6
3. MATERIALAK ETA METODOAK	7
3.1. Proba-organismoak.....	7
3.2. Antibiotikoa.....	7
3.3. Lurzoruaren prestakuntza.....	7
3.4. Toxikotasun-testa	8
3.4.1. Hilkortasuna eta pisu-galera.....	8
3.4.2. Azterketa histologikoak eta histokimikoak.....	8
3.4.3. Erriboflabina-kontzentrazioa.....	8
3.5. Azterketa estatistikoak.....	9
4. EMAITZAK	9
4.1. Hilkortasuna eta pisu-galera.....	9
4.2. Azterketa histologikoak eta histokimikoak.....	9
4.2.1. Digestio-epitelioaren altuera	10
4.2.2. Digestio-epitelioaren irregulartasunak.....	11
4.2.3. Epidermiseko mukopolisakaridoak	11
4.3. Erriboflabina-kontzentrazioa.....	12
5. EZTABAIDA	13
6. ONDORIOAK	16
7. ESKER ONAK	16
8. BIBLIOGRAFIA	16
9. ERANSKINAK	18

1. SARRERA

1.1. Antibiotikoek eragindako ingurumen-kutsadura eta osasun-kaltea

Antibiotikoak mikroorganismoek sortutako infekzioei aurre egiteko gaitasuna duten konposatu kimikoak dira. Alexander Fleming-ek 1928an penizilina aurkitu zuenetik (Fleming, 1944) giza medikuntzan eta albaitaritzan antibiotikoak erabiltzea ohiko praktika terapeutiko bihurtu da. Ondorioz, antibiotikoen kontsumoa handitu egin da eta, halaber, ingurunean pixkanaka metatzen joan dira, etengabeko isurien ondorioz. Europar Batasunean urteko ingurunera 15.000 tona farmako jariatzen direla aurreikusi da (Manzetti & Ghisi, 2014), eta mundu mailan 100.000-200.000 tona inguru (Kümmerer, 2003).

Antibiotikoak ingurumenera bide desberdinetatik irits daitezke. Gizakiei zuzendutako farmakoak hondakin-uren, zabortegien eta ospitale- zein industria-efluenteen bidez jaria daitezke ingurunera (Watkinson, et al., 2009). Erabili gabeko sendagai terapeutikoak estolderia-sistema bidez baztertzen dira, eta erabilitakoak, aldiz, gizakiek metabolismo fisiologikoaren bidez iraitzi ondoren, hondakin-uren araztegitara bideratzen dira. Ur zikinen tratamendu-prozesuan zenbait antibiotiko ez dira degradatzen. Gainera, araztegi tradizionalak ez daude diseinatuta farmakoak tratatzeko, ez baitituzte filtro bereziak antibiotikoak baztertzeko (Roy, 2019). Ondorioz, tratamenduaren amaieran farmakoak gainazaleko edo ur azpiko uretara iristen dira, baita edateko uretara ere. Bestalde, antibiotikoak albaitaritzan edo animalien haziera-sustatzaile gisa erabiliak badira, abereek metabolismo fisiologikoaren bidez zuzenean iraitzen dituzte lurzorura. Gainera, nekazaritzan ongari modura erabiltzen diren animalia-gorotzak ere antibiotikoak lurzorura iristeko beste bide bat dira (Kümmerer, 2003).

Antibiotikoek osagai ziklikoak dituzte beraien egituran. Horregatik, propietate metaegonkorrak dituzte, eta ez dira bioandatzten edo denbora luzea behar dute andea daitezen. Gainera, zenbaitek lurzoruari batzeko gaitasun altua dute. Bestalde, ingurunearen pH mailak, tenperaturak, hezetasunak eta mikrobio-populazioak ere farmakoen bioandatzte- eta bioeraldatzte-tasak baldintzatzen dituzte (Manzetti & Ghisi, 2014). Gaur egungo antibiotikoen erabilera masiboaren ondorioz, antibiotikoen biometaketa gertatzen ari da lurzoruan, eta horrek ingurumen-ekologian zein giza osasunean kalte larriak eragin ditzake. Zenbait ikerketak agerian utzi dute antibiotikoek animalia urtar eta lurtarrei kalte oxidatiboa eragiten dietela, eta lurzoruko mikrobio-komunitatearen bioerabilgarritasuna murrizten dutela (Ning, et al., 2022). Horrez gain, antibiotikoen biometaketak kaltea eragin dezake maila trofiko altuagoko animalietan (Mariño, et al, 1992). Adibide gisa, lurzoruan bizi diren organismoek kaltea eragiteaz gain, animalia horietaz elikatzen diren txoriei ere kaltea sor diezaike (Zhu, et al., 2019). Bestalde, antibiotikoekiko erresistentzia-gene kopurua handitu egin da bakterio-andui berrien garapenaren ondorioz, eta landare sustraien metabolismoa eraldatu da. Gainera, epe luzera ikusi da giza osasunean kalteak sor daitezkeela, ur- eta elikagai-kontsumoaren ondorioz (Ning, et al., 2022). Izan ere, gizakiok edaten dugun uretan eta jaten ditugun landare- zein animalia-jatorriko elikagaietan antibiotikoak daude. Beraz, horiek kontsumitzean gure organismora antibiotikoa barneratzen ari gara. Ondorioz, giza mikrobiota aldatzen da, eta gure gorputzean bizi diren bakterioek antibiotikoekiko

erresistentzia garatzen dute. Hesteko mikrobiotaren desorekak patogeno oportunisten proliferazioa bultzatzen du eta, halaber, zenbait gaixotasunen agerpena: kolitisa, hesteetako desorekak eta minbizia, besteak beste (Ben, et al., 2018). Gainera, bakterio horiek antibiotikoekiko erresistentzia garatu badute, gaur egun dauden tratamenduen porrota eragin dezakete, eta kasurik latzenetan pazientearen heriotza.

1.2. Tetrziklinaren ezaugarriak eta eragina osasunean zein ingurumenean

Tetrziklinak (TZ) 1940ko hamarkadan aurkitu ziren antibiotiko familia bat dira. Zenbait *Streptomyces* espezieetatik eratorriak izan daitezke, eta gaur egun 20 TZ konposatu daude eskuragarri merkatuan antibiotiko gisa. Egiturari dagokionez, eraztun tetrziklikoz osatutako sistemak dira, eta talde funtzional moduan hidroxilo, metilo, keto eta dimetilaminoak dituzte. Jatorriaren, dosiaren eta deuseztatze-denboraren arabera, 3 mota bereiz daitezke: oxitetrziklinak, klorotetrziklinak eta tetrziklinak (Ahmad, et al., 2021). TZek gaixotasunak sor ditzaketen hainbat mikroorganismoren aurkako aktibitatea dute, bakterio gram-positibo eta -negatiboen, mikoplasmaren, eta parasitoak diren protozooen aurkakoa, hain zuzen ere. Bestalde, ez dute albo-ondorio larrik, erraz xurgatzen dira, merkeak dira eta toxizitate selektibo altua dute (Chopra & Roberts, 2001). Hori dela eta, tetrziklinak giza eta animalia-infekzioak tratatzeko oso farmako erabiliak dira gaur egun. Adibide gisa, tetrziklina malariaren prebentziorako erabili izan da, *Plasmodium falciparum*-ek meflokinarekiko erresistentzia garatu duten kasuetan (Bunnag, et al., 1996). Gainera, zenbait herrialdetan farmakoa animaliei maila azpiterapeutikoan txertatzen zaie beraien haziera sustatzeko.

Tetrziklinen ekintza-mekanismoari dagokionez, mikroorganismoen proteinen sintesia inhibitzen dute, tRNAren eta mRNAren arteko kodoi-antikodoi elkarrekintzak gertatzea eragotzita. Hau da, aminoazil-tRNA ezin da batu hartzaille erribosomikora, 30S azpiunitatearen A gunera (Chopra, et al., 1992). Kontuan izanda tetrziklinen ituak zelula barnekoak direla, farmakoak ituekin elkarrekiteko mintz-sistema bat edo gehiago igaro behar ditu. Bakterio gram-negatiboen kasuan, tetrziklinak kanpo-mintza OmpF eta OmpC porina kanalen bidez igarotzen du. Horretarako, ioi metalikoekin, oro har, Mg^{2+} -arekin, konplexua osatzen du, zeina periplasmarantz erakarria izango den. Bertan, Mg^{2+} -tetrziklina konplexua disoziatu egiten da. Ondoren, tetrziklinaren propietate hidrofobikoak direla eta, barne-mintzeko bigeruz lipidikotik difusioz igarotzen da, eta zitosolera iristen da (Chopra, et al., 1992). Azken urrats hori bakterio gram-positiboek ere egiten dute tetrziklina zitosolera barneratzeko.

Tetrziklinak bakterioen aurkako antibiotikoen artean lehen aukera dira askotan, giza zein animalia-osasunerako oso abantailatsuak baitira. Hala ere, tetrziklinen gehiegizko erabilerak gizakietan erreakzio alergikoak sortzen ditu, bakterio-erresistentziak garatzea eragiten du eta ingurumen-mikrofloran aldaketa esanguratsuak eragiten ditu. Kalteak eragitearen arrazoi nagusia da metabolizatzeko zailak direla. Ondorioz, giza zein animalia-gorotzen bidez barneratutako tetrziklinaren % 50-80 inguru jariatzen da ingurunera (Ahmad, et al., 2021). Bestalde, oso konposatu egonkorak dira eta ingurunean oxidatzeko zailak. Gainera, gaur egun dauden ur-tratamenduko metodo konbentzionalak ez dira gai tetrziklinak era eraginkorrean

degradatzeko. Aipagarria da TZen erabilera masiboa dela eta, animalia-produktuetan, esnean, arrautzetan edo ezitan, besteak beste, tetraziklina hondarrak aurkitu direla (Ning, et al., 2022). Bestalde, ingurumenari dagokionez, Estatu Batuetan gainazaleko uretan tetraziklina hondarren $0.11 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ -ko kontzentrazioa aurkitu da, ur zikinen araztegien isurbideetan $0.55 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ -koa eta horien efluenteetan $0.17 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ -koa (Jeong, et al. 2010). Etorkizunean, tetraziklinek epe luzera izango dituzten efektu kaltegarriek desoreka ekologikoa sor dezakete, gaur egungo tratamenduek tetraziklinak degradatzeko duten gaitasun baxua kontuan izanda (Ahmad, et al., 2021). Beraz, garrantzitsua da ekotoxikologia arloan tetraziklinak dituen eraginak ikertzen jarraitzea.

1.3. Lur-zizareak lurzoruaen toxizitatea neurtzeko organismo modelo gisa

Antibiotiko batek lurzoruan sortzen dituen kalteak balioztatzeko lur-zizareak erabil daitezke. Lur-zizareak lurzoruko ekosistemaren mantenuan zeregin garrantzitsua betetzen duten lehorreko animalia ornogabeak dira, eta “lurzoruko ingeniari” deritze. Izan ere, lurzoruaen emankortasuna bermatzen dute higaduraren, iraiizketaren eta elikaduraren bidez. Bestalde, humusaren eraketan, pedogenesian, mantenugaien zikloan, mikrobio-aktibitatearen handipenean eta mineralen higaduran parte hartzen dute (Ojha & Devkota, 2014). Ekotoxikologian sarri erabiltzen diren organismo modeloak dira, elikadura-katearen behealdean kokatzen baitira, eta lurzoruko kutsatzaileekin kontaktu estua baitute. Gainera, hazkuntza-ziklo laburra, kutsatzaileekiko sentikortasuna eta banaketa-gaitasun zabala dituzte (Ning, et al., 2022). Lur-zizare espezieen artean *Eisenia fetida* organismoa aztertu da gehien. Izan ere, organismo epigeoa da, eta konpostean edo materia organikoan egoten da. Bestalde, hermafrodita da, ingurumen-baldintza ezberdinak jasan ditzake, 2 hilabetean heldutasuna lortzen du, eta ondorengo asko izaten ditu (Edwards, 2004).

Zizareek lurzoruko osagaiak, horien artean konposatu toxikoak, xurgatzeko gaitasun altua dute, larruazalaz lurzoruaerikiko duen kontaktu zuzenagatik eta lurra irensteagatik. Lur-zizareen anatomiarri dagokionez, tegumentua deritzon kanpo-geruza babeslea eta digestio-barrunbea bereiz daitezke. Kanpo-geruza lur-zizareen osotasuna mantentzeaz arduratzen da, eta arnasketaren erantzulea da, oxigenoa odolean sartzen uzteko ardura baitu. Tegumentuan kutikula eta epidermisa bereiz daitezke. Kutikula kolagenozko geruza da, eta epidermisarekin muga dago (Coggeshall, 1966). Epidermisa, aldiz, epitelio bakun oso iragazkorra da, eta zelula mota desberdinez osatuta dago. Horien artean zelula muki-jariatzaileak edo mukozitoak aipa daitezke. Mukozitoek zizarea hidratatuta mantentzen dute, lokomozioan laguntzen dute eta zizarea babesten dute estres-egoeretan (Cinar, et al. 2014). Zelula horiek jariatzen duten mukia ur, lipido, proteina eta mukopolisakaridoen arteko nahasketa konplexua da (Zhang, et al., 2016). Ikusi izan da zizareek estres egoeratan muki gehiago jariatzen dutela, estresaren eta estimulu bortitzen aurkako mekanismo moduan (Wang, et al., 2011).

Bestalde, lur-zizareen barrunbean muskulua, zeloma eta digestio-hodia daude. Digestio-hodian tiflosolea, digestio-epitelioa eta ehun kloragogenikoa bereiz daitezke (Irizar, et al. 2014). Tiflosolea zizarearen heste-

hormari barnealdetik lotuta dagoen tolestura-egitura da, eta ehunaren azalera handitzeko funtzioa du, mantenugaien xurgapena handitzeko. Mantenugaien xurgapena handitzeaz gain, kutsatzaileena ere handitzen duenez, toxinen eragina aztertzeke ehun eraginkorra da (Jamieson, 1992). Digestio-epitelioa xurgapenerako, digestiorako eta mugikortasunerako garrantzitsua da, eta funtzio neuroendokrinoetan zein immunologikoetan parte hartzen du. Ehun kloragogenikoa, zelomaren eta digestio-epitelioaren artean kokatzen da, eta toxinen metaketa- eta kanporaketa-ehun nagusia da, digestio-epitelioarekin batera (Morgan, et al., 2002). Lurzorua irenstea kutsatzaileak xurgatzeko bide nagusietariko bat denez, batez ere epe luzeko esposizioetan, ehun kloragogenikoa eta digestio-epitelioa itu-ehun egokiak dira lurzoruaren toxizitatea aztertzeke. Bestetik, zeloma digestio-hodiaren eta tegumentuaren artean kokatzen den barrunbea da. Zizareen gorputz osoa igarotzen du, eta likido zelomikoz osatuta dago. Likido zelomikoa ingurumenarekin kontaktuan dago, eta zelomozitoz osatuta dago. Zelomozitoek lur-zizareen immunitate-sistemaren zati garrantzitsua osatzen dute. Izan ere, fagozitosian, patogenoen enkapsulazioan, homeostasian eta kutsatzaileen kanporaketan parte hartzen dute. Bi zelomozito azpipopulazio bereiz daitezke: eleozitoak eta amebozitoak. Eleozitoek elikadura-funtzioak eta bigarren mailako beste hainbat funtzio betetzen dituzte. Amebozitoak, aldiz, immunitate-sisteman parte hartzen duten immunozito efektoreak dira (Bilej, et al., 2010). Eleozitoek kutsatzaileekiko sentikortasun altuagoa dute (Irizar, et al., 2014). Gainera, aipagarria da *Eisenia fetida* zizareetan eleozitoek erriboflabina deritzon B2 bitamina autofluoreszentea dutela. Erriboflabina immunozitoen erakarpenaz arduratzen den molekula kimioerakarlea da, eta erantzun-immunea mobilizatzen du, konposatu toxikoen ostalariaren eta mikrobioen/parasitoen desoreka eragitean (Mazur, et al., 2011).

Lan honetan antibiotikoen zizareetan duten eragina aztertzeke biomarkatzaileak erabili dira. Biomarkatzaileak kutsatzailearen maila azpiletalen eraginpean ehun-, zelula- eta molekula-mailan gertatzen diren aldaketak dira (Irizar, et al., 2014). Biomarkatzaileek organismoek kutsatzaileen aurrean nola erantzuten duten aztertzeke aukera ematen dute (Martín-Díaz, et al., 2004). Ehun-mailan, *Eisenia fetida*-n ehun kloragogenikoko eta digestio-epitelioko aldaketa histologikoak aztertu ohi dira. Horien artean nekrosia, lodieraren murriztea edota ehunaren kalteak (Irizar, et al., 2014). Bestalde, tegumentuan gertatzen diren aldaketak ere ehun-mailako biomarkatzaileak dira. Horien artean, mukozitoen kopuru-aldaketak aztertzea da ohikoena (García-Velasco, et al., 2016). Maila azpizelularrean kalzeina azetoximetil esterraren aktibitatea erabil daiteke biomarkatzaile gisa, toxizitatea balioztatzeko eta zelomozitoen bideragarritasuna aztertzeke (Kwak, et al., 2014), baina horrez gain, zenbait ikerlanetan egin den moduan, erriboflabina-kontzentrazioa neur daiteke hainbat substantzia toxikoren eragina aztertzeke (Plytycz, et al., 2010).

2. HELBURUAK

Lan honen helburua da tetraziklina-kontzentrazio desberdinek *Eisenia fetida* zizarean duten eragina aztertzea, ehun-mailan, zelula-mailan eta maila azpizelularrean, biomarkatzaile ezberdinak erabiliz eta toxizitate-test estandarrak jarraituz.

3. MATERIALAK ETA METODOAK

3.1. Proba-organismoak

Eisenia fetida lur-zizareak LOMBRICOR S.C.A. (Kordoba, Espainia) enpresa komertzialean erosi dira. Esperimentua egin aurretik zizareak Zoologia eta Animalia Zelulen Biologia Saileko terrariumean mantendu dira, ilunpetan, hezetasun konstantean eta $19 \pm 2^\circ\text{C}$ -ko tenperaturan. Zaldi-gorotzak erabili dira zizareen janari-iturri gisa. Esperimenturako klitelodun 160 zizare heldu aukeratu dira, 250 mg-tik gorako pisua dutenak.

3.2. Antibiotikoa

Esperimentuan tetraziklina komertziala (Merck/Sigma-Aldrich (T3258); Merck Darmstadt, Alemania) erabili da.

3.3. Lurzoruaren prestakuntza

Esperimentua egiteko OECD lur artifiziala prestatu da eranskinetako 1. taulako prozedura jarraituz, OECD protokoloaren 207. arauaren arabera (OECD, 1984). Lurzoruaren osiera % 70 harea, % 20 kaolina eta % 10 turba izan da. Bestalde, pH-a 6.0 ± 0.5 artean egonkor mantendu da kaltzio karbonatoa gehituz (pisu osoaren % 0.01). Lur lehorrez betetako beirazko ontziak hezetzeko, tetraziklina-kontzentrazio desberdinetako ur disoluzioak erabili dira (OECD lurzoruaren uraren atxikidura-gaitasunaren % 40ra doitua). Azkenengo emaitza gisa 0 mg/kg (kontrola; tetraziklinarik gabe), 10 mg/kg, 100 mg/kg eta 1000 mg/kg tetraziklina duten lurzoruak lortu dira. Tratamendu bakoitzaren 4 erreplika egin dira.

Lurzoruen homogeneotasuna bermatzeko, osagaiak erabat nahastu dira, eta egun batez egonkortzen utzi dira. Amaierako ontzien pisua 750 g-koa izan da. Esperimentua hasi aurretik 160 zizareak kontrol-lurzoruan mantendu dira 24 orduz aklimatatzeko. Ostean, ontzi bakoitzean 10 zizare jarri dira, 40 zizare tratamenduko, eta 14 egunez mantendu dira etengabeko argipean eta hezetasun konstantean, elikagai ekarpenik gabe. Ontzien tapei zuloak egin zaizkie ontzi barnean oxigeno-sarrera bermatzeko (1. irudia).



1. irudia. 0mg/kg, 10 mg/kg, 100 mg/kg eta 1000 mg/kg tetraziklina-kontzentrazioak dituzten OECD lur artifizialez betetako beirazko ontziak.

3.4. Toxikotasun-testa

3.4.1. Hilkortasuna eta pisu-galera

Lur-zizareak testatzeko lurzoruetara sartu aurretik pisatu egin dira (250 mg inguru), eta esperimentazio-denbora bukatu ondoren berriz ere pisatu dira, pisu-galera kalkulatzeko. Bestalde, organismoen hilkortasuna behaketa zuzenaren bitartez aztertu da.

3.4.2. Azterketa histologikoak eta histokimikoak

Lur-zizare helduak OECD lur artifizialean 14 egunez egon ondoren, egun batez arazten utzi dira paper hezez betetako Petri kutxetan, digestio-hoditik lur arrastoak kentzeko. Araztutako animaliak disezcionatu egin dira, klitelo atzeko zonaldetik. Ostean, histologiako kaseteetan gorde dira. Laginak zuzenean fosfato indargetzailean (PBS; pH 7.2-7.4) indargetutako formaldehidoan (% 4) finkatu dira 24 orduz. Ondoren, laginak deshidratatu eta parafinan sartu dira, eranskinetako 2. taulako prozedura jarraituz. Horretarako, Leica ASP300 ehun-prozesatzailea (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Alemania) erabili da. Laginak parafinazko blokeetan posizio bertikalean inkluitu dira, ebaki transbertsalak lortzeko. Parafinan inkluitutako blokeak Leica RM2125RT mikrotomoan (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Alemania) moztu dira, eta 5 µm-ko lodierako ebakiak lortu dira. Lagin bakoitzetik hiru ebakidun 3 porta eskuratu dira.

Ebakiak 24 orduz berogailuan mantendu dira, gutxienez, 37-40 °C-ko tenperaturan. Jarraian, histologiako laginak bi tindaketen bidez tindatu dira, eranskinetako 3/4. taulako prozedurak jarraituz: Hematoxilina-eosina tindaketa topografikoa eta Alzian urdina polisakaridoen tindaketa histokimikoa. Hematoxilina-eosina tindaketa Leica Autostainer XL makinan egin da, eta Alzian urdinaren tindaketa eskuz. Hematoxilina-eosina bidez tindatutako laginen irudiak Olympus BX-51 argi-mikroskopia (Olympus Corporation, Tokyo, Japonia) eskuratu dira. Ondoren, irudiak ImageJ (National Institute of Health, USA) softwarearekin aztertu dira, eta digestio-hodiaren barne eta kanpo profilak irudikatu dira, horien azalera eta perimetroa neurtzeko. Balio horien bidez digestio-hodiaren altuera eta irregulartasun-maila neurtu dira. Alzian urdinez tindatutako laginetan, Olympus BX-51 argi-mikroskopia bidez zizare bakoitzaren tegumentuaren 5 argazki eskuratu dira. Jarraian, ImageJ irudi-analisiaren bitartez, mukozitoek betetako dentsitate bolumetrikoa neurtu da.

3.4.3. Erriboflabina-kontzentrazioa

Araztutako animaliak 5 zizareko bi taldetan hartu, eta estruzio-fluidoan murgildu dira (% 0,02 EDTA PBS-an eta % 0,23 NaCl, 1 ml zizareko). Jarraian, elektrikoki estimulatu dira 9 V-ko pila batekin. Askatutako likido zelomikoa jaso ondoren, zentrifugatu egin da 5 minutuz 1500 rpm-tan, eta gainjalkina hartu da. Erriboflabina-maila fluoreszentsia neurtuz aztertu da, lagina 96 putzuko plakan jarri ostean. Neurketa FLx 800 mikroplaka fluoreszentsia irakurlean (BioTek, Agilent Technologies, Santa Clara, USA) egin da, 490 nm-ko kitzikapen uhin-luzeran eta 520 nm-ko igorpen uhin-luzeran. D erriboflabina komertziala (Merck/Sigma-Aldrich (1.07609); Merck, Darmstadt, Alemania) erabili da estandar gisa.

3.5. Azterketa estatistikoak

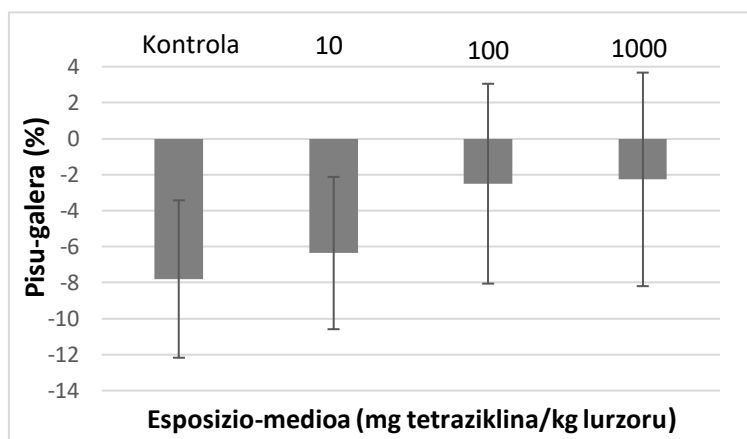
Digestio-epitelioaren altuera eta irregulartasunak, mukozitoek betetako azalera erlatiboa eta erriboflabinaren fluoreszentzia talde desberdinetan konparatzeko, lehenik datuek banaketa normala eta homogeneoa dutela baieztatu da. Ostean, ANOVA testa eta ondorengo Tukey testa, zein t-student testa aplikatu dira, eta $p < 0.05$ esangarritasun-maila ezarri da. Azterketa estatistikoak egiteko Jamovi 2.2.5. programa erabili da.

4. EMAITZAK

4.1. Hilkortasuna eta pisu-galera

Organismoen hilkortasunari dagokionez, tetraziklinarekiko 14 eguneko esposizio-denboran ez da hilkortasunik ikusi. Hau da, erabilitako tetraziklina-kontzentrazioek ez dute eragin organismoen heriotza.

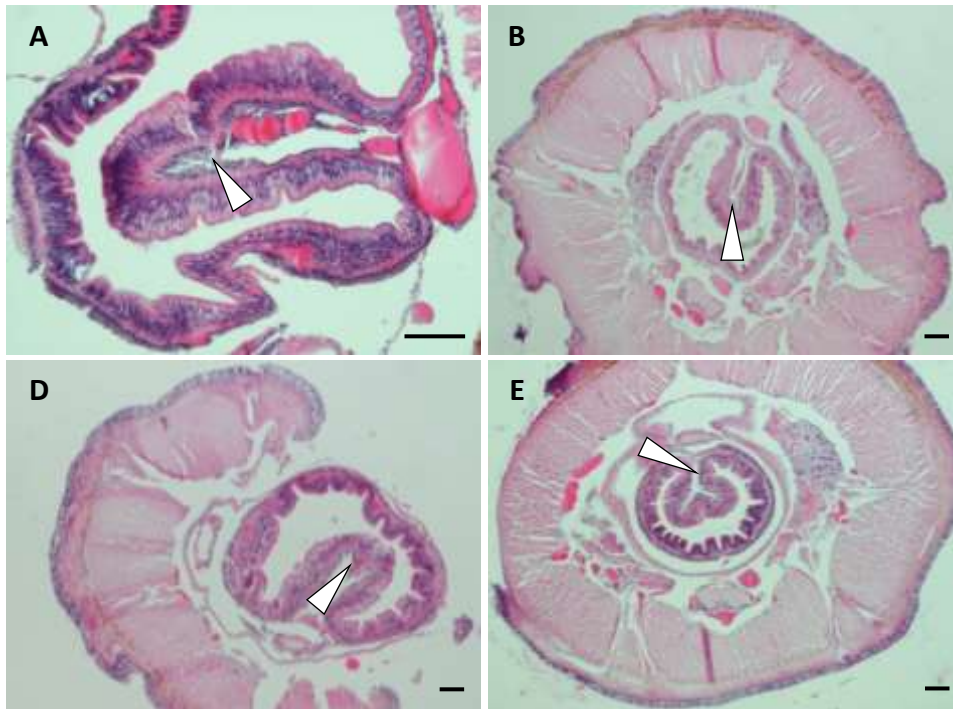
Zizareen pisu-galerari dagokionez, zizare kontrolak % 7.8ko pisu-galera erakutsi dute, eta pisu-galera handieneko taldea izan dira (2. irudia). Bestalde, 10 mg/kg-dun lurtean egon diren zizareek % 6.36ko pisu-jaitsiera izan dute; 100 mg/kg-dun lurtean egon direnek % 2.5ekoa eta 1000 mg/kg-dun lurtean egon direnek % 2.26koa (2. irudia). Hala ere, emaitzek ez dute desberdintasun esangarririk erakutsi euren artean ($p > 0.05$).



2. irudia. Esposizio-medioaren arabeko zizareen pisu-galera. Zutabe-barrek balioen batezbestekoa erakusten dute, eta segmentu bertikalek desbideraketa estandarra.

4.2. Azterketa histologikoak eta histokimikoak

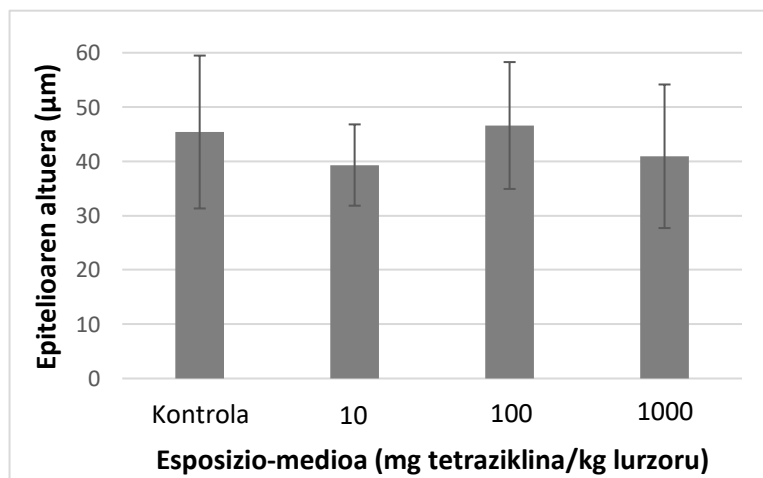
Argi mikroskopio bidez eskuratutako zizareen digestio-hodiaren irudi histologikoen (3. irudia) ez dute tetraziklina-tratamenduen arteko aldakortasun adierazgarriak erakusten. Kasu guztietan alterazio histologikorik gabeko liseri-epitelioak eskuratu dira, atrofia edota nekrosirik gabeak. Gainera, tiflosolea nabaria da. Tiflosolea digestio-hodian barrurantzko tolestura moduan ageri da irudietan.



3. irudia. *Eisenia fetida* zizareen digestio-hodiaren zeharkako ebakien irudi histologikoak Hematoxilina-eosina tindaketarekin, zizareak tetraziklinarekin 14 egunez kontaktuan egon ondoren. (A) 0 mg TZ/kg lurzoru, (B) 10mg TZ/kg lurzoru, (D) 100 mg TZ/kg lurzoru eta (E) 1000 mg TZ/kg lurzoru. Hiruki zuriekin tiflosolea adierazi da. Eskala barra 100 μ m.

4.2.1. Digestio-epitelioaren altuera

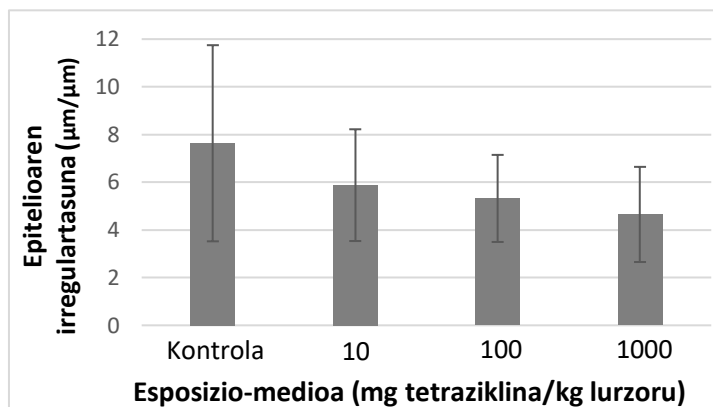
Digestio-epitelioaren altuerari dagokionez, tetraziklinarik gabeko lurzoruan egondako lur-zizareetan 45.4 μ m-ko altuera du digestio-epitelioak; 10 mg/kg-dun lurretan egondako zizareetan 39.31 μ m-koa, 100 mg/kg-dun lurretan egondakoetan 46.6 μ m-koa eta 1000 mg/kg-dun lurretan egondakoetan 40.93 μ m-koa (4. irudia). Emaitzek ez dute alde esangarririk islatzen talde esperimental desberdinen artean ($p > 0.05$).



4. irudia. Espozizio-medioaren arabeko zizareen digestio-epitelioaren altuera. Zutabe-barrek balioen batezbestekoa erakusten dute, eta segmentu bertikalek desbideraketa estandarra.

4.2.2. Digestio-epitelioaren irregulartasunak

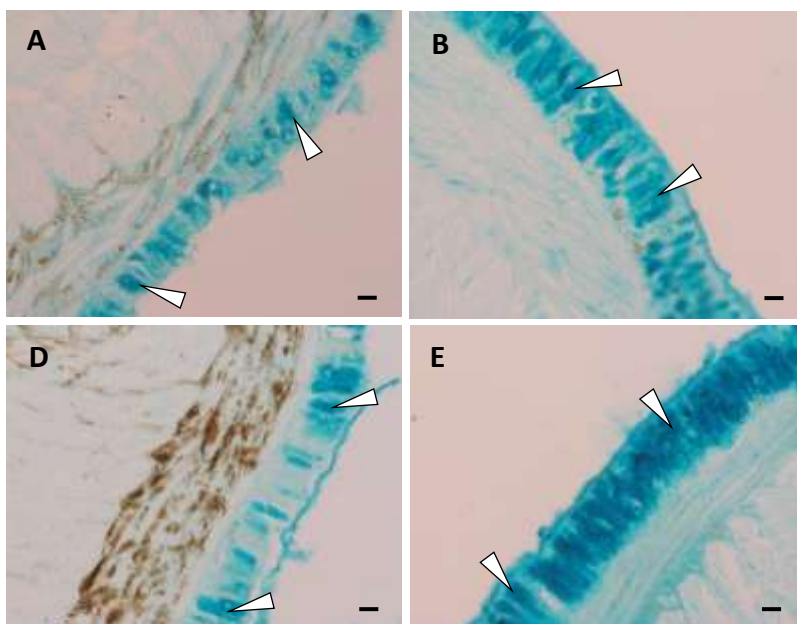
Digestio-epitelioaren irregulartasunei dagokienez, irregulartasun-maila altuena lurzoru-kontrollean egondako zizareetan ikusi da, $7.63 \mu\text{m}/\mu\text{m}$ -koa. 10 mg/kg -dun lurrean egondako lur-zizareetan $5.88 \mu\text{m}/\mu\text{m}$ -koa izan da, 100 mg/kg -dun lurrean egondakoena $5.32 \mu\text{m}/\mu\text{m}$ -koa eta 1000 mg/kg -dun lurrean egondakoena $4.65 \mu\text{m}/\mu\text{m}$ -koa (5. irudia). Hala ere, emaitzek ez dute desberdintasun esangarririk erakusten ($p > 0.05$).



5. irudia. Esposizio-medioaren araberako zizareen digestio-epitelioaren irregulartasun-maila. Zutabe-barrek balioen batezbestekoa erakusten dute, eta segmentu bertikalek desbideraketa estandarra.

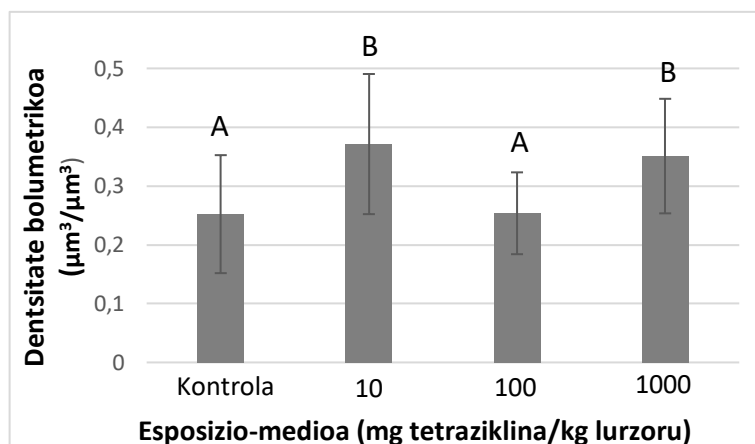
4.2.3. Epidermiseko mukopolisakaridoak

Argi mikroskopio bidez eskuratutako zizareen epidermiseko polisakaridoen irudi histologikoetan (6. irudia), mukopolisakaridoak kolore urdin biziago batez tindatu dira. Tindaketa honetan tendentzia bat ikusten da: desberdintasunak oso nabariak izan ez arren, ematen du 1000 mg TZ/kg lurzoruko tratamenduan mukozitoen tindaketa-intentsitatea eta dentsitate bolumetrikoa handiagoak direla.



6. irudia. *Eisenia fetida* zizareen tegumentuaren irudi histologikoak Alzian urdina tindaketarekin, zizareak tetraziklinarekin 14 egunez kontaktuan egon ostean. (A) 0 mg TZ/kg lurzoru, (B) 10 mg TZ/kg lurzoru, (D) 100 mg TZ/kg lurzoru eta (E) 1000 mg TZ/kg lurzoru. Hiruki zuriekin mukozitoak adierazi dira. Eskala barra $10 \mu\text{m}$.

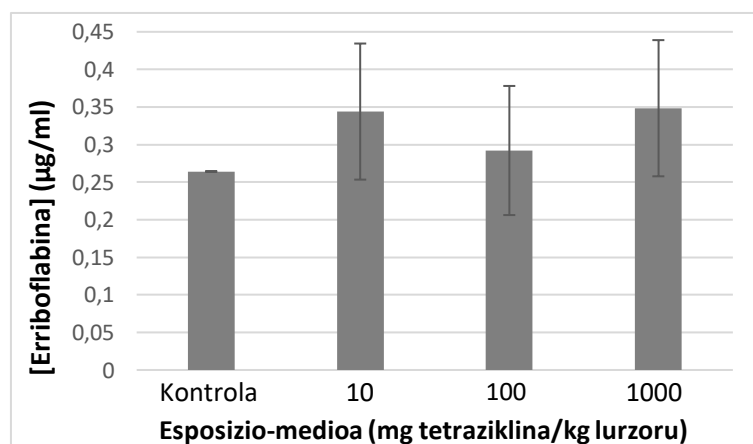
Tegumentuko polisakaridoen dentsitate bolumetrikoren kuantifikazioari dagokionez, kontrol-dun lurrean egondako zizareetan batez besteko balioa $0.25 \mu\text{m}^3/\mu\text{m}^3$ -koa izan da. 10 mg/kg-dun lurrean egondako zizareetan $0.37 \mu\text{m}^3/\mu\text{m}^3$ -koa, 100 mg/kg-dun lurrean egondakoetan $0.25 \mu\text{m}^3/\mu\text{m}^3$ -koa eta 1000 mg/kg-dun lurrean egondakoetan $0.35 \mu\text{m}^3/\mu\text{m}^3$ -koa (7. irudia). Kasu honetan, kontrol-lurzoruan eta 100 mg/kg-ko tratamendupean egon diren zizareek balio esangarriki baxuagoak erakusten dituzte 10 eta 1000 mg/kg-ko tratamendupean egondako zizareek baino ($p < 0.05$).



7. irudia. Esposizio-medioaren arabeko zizareen tegumentuko polisakaridoen dentsitate bolumetrikoa. Zutabe-barrek balioen batezbestekoa erakusten dute, eta segmentu bertikalek desbideraketa estandarra. A eta B hizkiak taldeen arteko desberdintasunak estatistikoki esanguratsuak direla adierazteko erabili dira ($p < 0.05$).

4.3. Erriboflabina-kontzentrazioa

Erriboflabina-kontzentrazioari dagokionez, lurzoru-kontrollean egondako zizareek $0.26 \mu\text{g/ml}$ -ko erriboflabina-kontzentrazioa dute. 10 mg/kg-tan egondako zizareek $0.34 \mu\text{g/ml}$ -koa, 100 mg/kg-tan egondakoek $0.29 \mu\text{g/ml}$ -koa eta 1000 mg/kg-tan egondakoek $0.35 \mu\text{g/ml}$ -koa (8. irudia). Hala ere, emaitzek ez dute desberdintasun esangaririk erakusten taldeen artean ($p > 0.05$).



8. irudia. Esposizio-medioaren arabeko zizareen zelomako erriboflabina-kontzentrazioa. Zutabe-barrek balioen batezbestekoa erakusten dute, eta segmentu bertikalek desbideraketa estandarra.

5. EZTABAIDA

Gaur egungo antibiotikoen erabilera masiboa dela eta, ingurunera jariatutako tetraziklina-kontzentrazioa emendatu egin da (Ahmad, et al., 2021). Tetraziklinak ingurunera hondakin-uren, zabortegien, ospitale- eta industria-efluenteen bidez jariatzen dira (Watkinson, et al., 2009). Bestalde, animalien zuzeneko irazketaren ondorioz, eta animalia-gorotzak ongarri gisa erabiltzeagatik ere isuriak izan daitezke (Kümmerer, 2003). Lurzoruan eta uretan disolbatuta dagoen tetraziklinak ingurumen-mikrofloran aldaketa esanguratsua sortzen ditu. Bakterio-erresistentziak garatzeaz gain, organismo lurtarrei eta urtarrei kalte oxidatiboa eragiten die, eta giza osasunerako kaltegarria da (Ning, et al., 2022). Gainera, kaltea eragin dezake maila trofiko altuagoko animalietan (Mariño, et al., 1992). Beraz, garrantzitsua da ekotoxikologia arloan ikertzen jarraitzea, tetraziklinak ingurumenean eta giza osasunean sor ditzakeen kalte posibleak ezagutzeko.

Lurzoruko animalietan tetraziklinak organismo- eta ehun-mailan, zein maila azpizelularrean dituen eraginak ikertzeko, ikerlan honetan *Eisenia fetida* lur-zizareetan biomarkatzaile desberdinak aztertu dira, zizareak tetraziklina-kontzentrazio ezberdinetako lurzoruetan 14 egunez egon ondoren. Aipatu beharra dago esperimentera ikerketa-proiektu handiago baten parte dela. Kimika Analitikoko sailean gure esperimenterako erabili diren lurzoruan zenbateko tetraziklina-kontzentrazioa dagoen zehaztu da, eta zizareek zenbat TZ barneratu duten. Horretarako, ICP-MS (Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry) metodoa erabili da. Teknika hori oraindik ere tetraziklinaren erabilerarako garapen bidean dago eta, beraz, dosi txikiak ez du sentikortasun handirik. Hori dela eta, soilik dosi handieneko lurzoruarekin (1000 mg TZ/kg lurzoru) egin dira analisiak. Kimikariek antibiotikoaren esposizio teorikoa 14 egunetara esposizio errealekin bat datorrela zehaztu nahi izan dute. Emaitzek erakutsi dute 14 egun igaro ondoren, tetraziklinaren kontzentrazioa lurzoruan 550 mg/kg-koa dela. Kontzentrazio teorikoarekin (1000 mg/kg) dagoen aldeak iradokitzen du esposizioa ez dela egokia izan, edota tetraziklinaren degradazioa esperotakoa baino altuagoa izan dela. Edozein kasutan, esposizio-maila ingurumenean egon daitekeena baino altuagoa denez, esanguratsua dela esan dezakegu. Horrez gain, zizareek 81.2 mg/kg-ko tetraziklina-kontzentrazioa barneratu dute. Beraz, azpimarra dezakegu tetraziklinaren metaketa-ahalmena zizareetan oso mugatua dela, ingurumenarena baino 6 aldiz txikiagoa, hain zuzen ere. Emaitza horrek erakusten duena da digestio-hodian zeharreko edo kontaktu epidermiko bidezko tetraziklina-xurgapena oso mugatua dela. Emaitza hori azaltzeko beste aukera bat izan daiteke lurzoruaren banaketa ez-homogeneoa. Baina hori ziurtatzeko neurketa berri eta gehiagoren zai gaude une honetan.

Esperimentu honetan organismo-mailan aztertutako biomarkatzaileei dagokienez, talde esperimentalen artean ez da desberdintasun esangarririk ikusi. Alde batetik, zizareen hilkortasunari dagokionez, ikerketa honetan erabili diren baldintza esperimentalek ez dute zizareen heriotzarik eragin. Emaitza hori bat dator aurretik egin diren esperimentuetan lortutako emaitzekin (Pino, et al., 2015). Esperimentuaren helburua maila azpizelularrean ehun- eta zelula-biomarkatzaileak erabiliz tetraziklinak zizareetan duen eragina aztertzea

izan da. Beraz, esperimentuan zehar tetraziklina-kontzentrazioak eta esposizio-denborak zizareen heriotza eragiten ez dutela bermatu nahi izan da. Aurretik egindako ikerketa batean aztertu dute 2000 mg/kg arte zizareak bizirik mantentzen direla, eta lan honetako emaitzek datu horiek berresten dituzte (Pino, et al., 2015). Bestetik, pisu-galerari dagokionez, talde esperimental ezberdinen artean lortutako emaitzek ez dute desberdintasun esangarririk erakutsi. Beraz, tetraziklinaren organismo-mailako eraginaren inguruko informazio gutxi eskaintzen digu. Hala ere, talde guztietan pisu-galera egon da, baita lurzoruko kontrollean egondako zizareetan ere. Horren arrazoia esperimentuan zehar erabilitako lur artifizialak zizareetan sortu duen estresa izan daiteke. Izan ere, 24 orduz zizareak tratamendurik gabeko lurzoruan aklimatatzen utzi diren arren, agian aklimatatzeko-denbora ez da nahikoa izan zizareak baldintza berri horietara guztiz egokitzeko.

Ehun-mailan aztertu diren biomarkatzaileei dagokienez, ez da tratamendu desberdinen pean egondako zizareetan tendentzia argirik antzeman. Tetraziklina-kontzentrazioak handitu ahala, digestio-epitelioan eragindako kalteak handiagoak izatea espero da, eta epitelioaren altuera murriztea eta sinpleagoa (irregulartasun-maila txikia) bihurtzea (Irizar, et al., 2014). Epitelioaren altuerari dagokionez, horrelakorik ikusi ez denez, agerikoa da baldintza esperimental hauetan tetraziklina gutxi barneratzen dela digestio-hoditik, digestio-epitelioan kalteak eragin ditzan. Gainera, epitelioaren atrofia edo nekrosirik ez da ikusi histologiako laginetan. Hala ere, aipagarria da zizareak tetraziklina-kontzentrazio handiagoko lurzoruetan egon direneko kasuetan, digestio-epitelioak borobiltzeko joera hartu duela. Beraz, ondorioztatu daiteke tetraziklinaren estresak liseri-epitelioko zeluletan baduela nolabaiteko eragina. Gure emaitzak ikusita, eraginkorragoa izan daiteke digestio-epitelioaren kalteak ehun-mailan aztertu beharrean, etorkizuneko ikerketetan zelula-mailako azterketak egitea. Adibidez, lipofuszen metaketa edo apoptosi/autofagia prozesuak aztertzea (Irizar, et al., 2014; Shi, et al., 2017). Bestalde, epitelioa zenbat eta irregularragoa izan, zizareak mantenugaiak xurgatzeko duen xurgapen-azalera handiagoa da. Hori zizareek digestioa optimizatzeko erabiltzen duten mekanismo bat da. Tetraziklinak sortutako estresagatik digestio-epitelioaren xurgapen-ahalmena arriskuan egon daiteke. Beraz, nahiz eta emaitzek erakusten dituzten desberdintasunak estatistikoki esangarriak ez izan, erreplika kopurua handituko balitz, desbideraketa murriztea lortuko litzateke, eta taldeen artean desberdintasun esanguratsuek lortzea.

Epidermiseko polisakaridoei dagokienez, argi mikroskopioz eskuraturiko histologiako irudietan ikusten da 1000 mg/kg-ko tratamendupean egon diren zizareek tegumentuan mukopolisakarido-kontzentrazio altuagoak dituztela. Bestalde, polisakaridoen dentsitate bolometrikoaren neurketek erakusten dute estimulu txiki bat eragin dela 10 eta 1000 mg/kg-ko tratamendupean egondako zizareetan. Horren arrazoia izan daiteke tetraziklina-kontzentrazioak eragindako estresaren aurrean, zizareek babes-mekanismo gisa muki gehiago jariatzen dutela. Zenbait ikerketetan ikusi izan da zizareek estres egoeratan muki gehiago jariatzen dutela, estresaren eta estimulu bortitzen aurkako mekanismo moduan (Wang, et al., 2011). Beraz, gure emaitzak bat datoz ikerketa horiekin. Hala ere, aipatu beharra dago 100 mg TZ/kg-ko lurzoruan egon diren

zizareetan ez dela estimulaziorik egon. Hori agian tetraziklina lurzoruan era homogeenan banatu ez delako eta, ondorioz, zizareek gutxi barneratu dutelako izan daiteke. Erantzun hori zein neurritaraino den toxikoa finkatzeko, interesgarria litzateke denbora luzeagoz animaliak tetraziklinaren pean jartzea. Izan ere, ikerketa batzuetan nabarmendu da gehiegizko muki-jariapen hori luzaroan mantentzen bada, azkenean zizareen deshidratazio kaltegarria gertatzen dela (Hereng, et al., 2021). Beraz, 1000 mg/kg-ko tratamenduaren baldintzak benetan gogorak diren ala ez aztertzeko, interesgarria izango litzateke, hasierako erantzuna gertatu eta gero, muki-kopuruan beherakada bat gertatzen den ikertzea.

Azkenik, maila azpizelularrean neurtutako erriboflabina-kontzentrazioak erakusten du tetraziklinaren presentzian indukzio txiki bat gertatzen dela. Emaitzak oso adierazgarriak izan ez arren, tetraziklinaren aurrean zelomozitoek immunitate-sistema martxan jartzeko erriboflabina konposatu kimioerakarle gehiago jariatzen dutela ondoriozta daiteke (Plytycz, et al., 2010).

Emaitzak orotara aztertuta, ikusten dena da epidermisan tetraziklinak eragin handiagoa izan duela digestio-epitelioarekin alderatuta. Izan ere, emaitza esanguratsuenak erriboflabina-kontzentrazioan eta mukopolisakarido kopuruan antzeman dira. Kimikarien emaitzekin alderatuz, ondoriozta daiteke tetraziklinak zizareetan sartzeko eta metatzeko duen ahalmena oso mugatua dela, behintzat lan honetan erabilitako baldintza esperimentaletan. Bestalde, aipagarria da organismo- eta ehun-mailan ez dela emaitza adierazgarriarik egon, eta maila azpizelularrean, aldiz, eragin nabariagoak ikusi direla. Azken faktore hori kontuan izanik, etorkizunera begira, tetraziklinaren eragina aztertzeko zenbait azterketa esperimental berri egin daitezke. Alde batetik, tetraziklina-dosi altuagoak erabil daitezke. Hala ere, aipagarria da 10 mg/kg zein 100 mg/kg-ko tetraziklina-kontzentrazioak naturako baldintzetara hurbiltzen diren arren, 1000 mg/kg-ko kontzentrazioa errealitatekin aldentzen dela. Beraz, muturreko baldintza horietan lortutako emaitzak ez dira ingurunearekiko adierazgarriak. Beste aukera bat tetraziklinarekiko esposizio-denbora luzatzea izan daiteke. Izan ere, zizareak bi astez tetraziklinadun lurzoruan jarri ondoren informazio mugatua eskuratu da, lan hau lehenengo hurbilketa bat soilik baita. Denbora luzez eragiten die tetraziklinak lurzoruko organismoek, eta hori aztertzeko beharrezkoa izango litzateke epe luzeko ikerketak egitea, esaterako, 56 egunekoak, OECDren ugalketa-testak proposatzen duen moduan (OECD, 2016). Azkenik, bestelako neurketak egitea ere aproposa izan daiteke. Tetraziklinak ehun- zein zelula-mailan duen eragina murriztu izanik, azterketa biokimikoak egin daitezke gene- eta entzima-mailan farmakoak duen eragina aztertzeko. Izan ere, toxina batek organismo batean lehenengo interakzioak beti molekula mailan ditu. Beraz, emaitza adierazgarriak lortzeko bide bat izan daiteke. Adibidez, DNA kalteak eragiten dituen azter daiteke edota SOD eta CAT entzima antioxidatzaileen aktibitatea aldatzen den ikertu (Dong, et al., 2012). Datu horietatik abiatuz, gene-mailan zizareek elikagaiak xurgatzeko digestio-hodian arazorik ote duten jakin ahal izango litzateke, besteak beste. Gainera, zizareen digestio-hodiko mikrobio-komunitatea ere aztertzen ari da, zenbait ikerketatan egin den bezala (Chao, et al., 2020) (Ning, et al., 2022), erresistentzia-geneen sorrera ikertzeko.

6. ONDORIOAK

Tetraziklina-kontzentrazio desberdinen pean 14 egunez egondako *Eisenia fetida* lur-zizareetan ez da emaitza esanguratsurik lortu organismo- eta ehun-mailan. Izan ere, zizareek tetraziklina barneratzeko ahalmen baxua erakutsi dute. Digestio-hodiak borobiltzeko joera hartzen duela ikusi da, eta digestio-epitelioaren xurgapen-ahalmena arriskuan egon daitekeela. Gainera, TZ-kontzentrazio altuek sortutako estresaren aurrean, zizareek babes-mekanismo modura mukia jariatzen dutela ikusi da. Baita zizareek immunitate-sistema martxan jartzen dutela, erriboflabina-jariapena emendatuta.

Etokizuneko ikerketetan esposizio-denbora luzatu behar da, eta biomarkatzaile gehiago aztertu. Maila biokimikoan gene adierazpena eta entzimen aktibitatea aztertzea garrantzitsua izan daiteke, bai eta zizareetan bizi diren mikrobio-komunitateak garatzen dituzten erresistentzia-geneak aztertzea ere. Etokizunean, tetraziklinek epe luzera izango dituzten efektu kaltegarriek desoreka ekologikoak sor ditzaketenez, garrantzitsua da ekotoxikologia arloan tetraziklinak dituen eraginak ikertzen jarraitzea.

7. ESKER ONAK

Eskerrak eman nahi dizkiot Beñat Zaldibarra lan hau egiteko eman didan aukeragatik, eta lan esperimentalean zein lan idatzian eman didan laguntzagatik. Baita Nerea Garcíari eta Erik Urionabarrenetxeari ere, lan esperimentalean eskainitako laguntzagatik. Azkenik, eskerrak eman nahiko nizkioke nire familiari, ematen didaten babes eta laguntza guztiagatik.

8. BIBLIOGRAFIA

- Ahmad, F., Zhu, D., & Sun, J. (2021). Environmental fate of tetracycline antibiotics: degradation pathway mechanisms, challenges, and perspectives. *Environmental Sciences Europe*, 33(1).
- Ben, Y., Fu, C., Hu, M., Liu, L., Wong, M. H., & Zheng, C. (2018). Human Health Risk Assessment of Antibiotic Resistance Associated with Antibiotic Residues in the Environment: A Review. *Environmental Research*.
- Bilej, M., Procházková, P., Šilerová, M., & Jusková, R. (2010). Earthworm Immunity. *Advances in experimental medicine biology*, 708, 66-79.
- Bunnag, D., Karbwang, J., Na-Bangchang, K., Thanavibul, A., Chittamas, S., & Harinasuta, T. (1996). Quinine-tetracycline for multidrug resistant *falciparum* malaria. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*.
- Chao, H., Sun, M., Ye, M., Zheng, X., & Hu, F. (2020). World within world: Intestinal bacteria combining physiological parameters to investigate the response of *Metaphire guillelmi* to tetracycline stress. *Environmental Pollution*.
- Chopra, I., & Roberts, M. (2001). Tetracycline Antibiotics: Mode of Action, Applications, Molecular Biology, and Epidemiology of Bacterial Resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 65(2), 232-260.
- Chopra, I., Hawkey, P. M., & Hinton, M. (1992). Tetracyclines, molecular and clinical aspects. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 29(3), 245-277.
- Cinar, K., Oztop, M., & Demirbag, E. (2014). The histochemical characterization of the glycoconjugates in the epidermal mucous cells of the red Californian earthworm *Eisenia foetida*. *Journal of Histology*, 1-6.
- Coggeshall, R. E. (1966). A fine structural analysis of the epidermis of the earthworm, *Lumbricus terrestris* L. *The Journal of Cell Biology*, 28(1), 95-108.
- Dong, L., Gao, J., Xie, X., & Zhou, Q. (2012). DNA damage and biochemical toxicity of antibiotics in soil on the earthworm *Eisenia fetida*. *Chemosphere*, 89(1), 44-51.
- Edwards, C. A. (2004). *Earthworm ecology* (Segunda. ed.). Boca Raton, Florida, USA: CRC Press.

- Fleming, A. (1944). The discovery of penicillin. *Br. Med. Bull.*, 2(1), 4-5.
- García-Velasco, N., Gandariasbeita, M., Irizar, A., & Soto, M. (2016). Uptake route and resulting toxicity of silver nanoparticles in *Eisenia fetida* earthworm through Standard OECD Tests. *Ecotoxicology*, 25, 1543-1555.
- Hereng, Y., García-Velasco, N., Urionabarrenetxea, E., Soto, M., & Zaldibar, B. (2021). Determination of the effects produced by contaminated dredged sediment deposition in soils using cell and tissue level biomarkers in *Eisenia fetida* earthworms. *Iberoamerican Congress of Environmental Contamination and Toxicology*. Blumenau, Brasil.
- Irizar, A., Izagirre, U., Diaz de Ceria, O., Marigómez, I., & Soto, M. (2014). Zonation in the digestive tract of *Eisenia fetida*: Implications in biomarker measurements for toxicity assessment. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 160, 42-53.
- Jamieson, B.G.M. (1992). *Microscopic Anatomy of Invertebrates, Annelida* (Primera. ed.). New York, USA: Wiley-Liss.
- Jeong, J., Song, W., Cooper, W. J., Jung, J., & Greaves, J. (2010). Degradation of tetracycline antibiotics: Mechanisms and kinetic studies for advanced oxidation/reduction processes. *Chemosphere*.
- Kümmerer, K. (2003). Significance of antibiotics in the environment. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*.
- Kwak, J. I., Kim, S. W., & An, Y.-J. (2014). A new and sensitive method for measuring *in vivo* and *in vitro* cytotoxicity in earthworm coelomocytes by flow cytometry. *Environmental Research*, 134, 118–126.
- Manzetti, S., & Ghisi, R. (2014). The environmental release and fate of antibiotics. *Marine Pollution Bulletin*, 79(1-2), 7–15.
- Mariño, F., Ligeró, A., & Diaz Cosin, D. J. (1992). Heavy metals and earthworms on the border of a road next to Santiago (Galicia, northwest of Spain). Initial results. *Soil Biology and Biochemistry*, 24(12), 1705–1709.
- Martín-Díaz, M. L., Blasco, J., Sales, D., & DelValls, T. A. (2004). Biomarkers as tools to assess sediment quality. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 23(10-11), 807–818.
- Mazur, A. I., Klimek, M., Morgan, A. J., & Plytycz, B. (2011). Riboflavin storage in earthworm chloragocytes and chloragocyte-derived eleocytes and its putative role as chemoattractant for immunocompetent cells. *Pedobiologia*, 54, S37-S42.
- Morgan, A., Turner, M., & Morgan, J. (2002). Morphological plasticity in metal sequestering earthworm chloragocytes, morphometric electron microscopy provides a biomarker of exposure in field populations. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 21, 610-618.
- Ning, Y., Li, Y., Li, X., Shao, Z., Fu, H., Yuan, Y., & Zhou, D. (2022). Evolution of the earthworm (*Eisenia fetida*) microbial community *in vitro* and *in vivo* under tetracycline stress. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 231.
- Ojha, R., & Devkota, D. (2014). Earthworms: ‘Soil and Ecosystem Engineers’ – a review. *World Journal of Agricultural Research*, 2, 257-260.
- Organization for Economic Cooperation and Development (OECD). (1984). *Earthworm, Acute Toxicity Tests-207*. OECD guideline for testing of chemicals.
- Organization for Economic Cooperation and Development (OECD). (2016). *Earthworm, Reproduction Tests-222*. OECD guideline for testing of chemicals.
- Pino, M. R., Val, J., Mainar, A. M., Zuriaga, E., Español, C., & Langa, E. (2015). Acute toxicological effects on the earthworm *Eisenia fetida* of 18 common pharmaceuticals in artificial soil. *Science of The Total Environment*, 518-519, 225–237.
- Plytycz, B., Kielbasa, E., Grebosz, A., Duchnowski, M., & Morgan, A. (2010). Riboflavin mobilization from eleocyte stores in the earthworm *Dendrodrilus rubidus* inhabiting aerially-contaminated Ni smelter soil. *Chemosphere*, 81, 199-205.
- Roy, A. G. (2019). Antibiotics in water. *Nature sustainability*.
- Shi, Z., Tang, Z., & Wang, C. (2017). A brief review and evaluation of earthworm biomarkers in soil pollution assessment. *Environmental Science and Pollution Research*, 24(15), 13284-13294
- Wang, Z., Cui, Z., Liu, L., Ma, Q., & Xu, X. (2011). Toxicological and biochemical responses of the earthworm *Eisenia fetida* exposed to contaminated soil: Effects of arsenic species. *Chemosphere*, 154, 161-170.
- Watkinson, A., Murby, E., Kolpin, D., & Costanzo, S. (2009). The occurrence of antibiotics in an urban watershed: From wastewater to drinking water. *Science of the Total Environment*, 407(8), 2711-2723.
- Zhang, D., Chen, Y., Ma, Y., Guo, L., Sun, J., & Tong, J. (2016). Earthworm epidermal mucus: rheological behavior reveals drag-reducing characteristics in soil. *Soil and Tillage Research*, 158, 57-66.
- Zhu, D., Xiang, Q., Yang, X., Ke, X., O'Connor, P., & Zhu, Y.-G. (2019). Trophic Transfer of Antibiotic Resistance Genes in a Soil Detritus Food Chain. *Environmental Science & Technology*.

9. ERANSKINAK

1. taula. OECD lur artifizialaren prestaketa

GUZTIRA 750 g (pisu hezea)	OECD lurzoruen WHC = % 21.91	Prestatutako lurzoruek WHCren % 40
H ₂ O destilatua		66 ml
Lur lehorra	Harea % 70	478.4 g
	Kaolina % 20	136.8 g
	<i>Sphagnum</i> turba % 10	68.4 g
	CaCO ₃ % 0.01	0.684 g
		684g

* WHC = *water holding capacity* edo uraren atxikipen-gaitasuna

2. taula. Laginen prestaketa histologikoa

Urrats histologikoa	Produktua	Denbora
Fixapena	Formaldehidoa % 4	24 h
Deshidratazioa	Etanola % 70	1 h
	Etanola % 96	2 x 1 h
	Etanol absolutua	2 x 1 h
	Xilol:Etanol absolutua 1:1 diluzioa	1h
	Xilola	2 x 1 h
Inklusioa parafinan	Parafina (55-60°C)	3 x 2 h

3. taula. Hematoxilina-eosina tindaketaren protokoloa

Produktua	Denbora
Xilola	2 x 10 min
Etanol absolutua	2 x 2 min
Etanola % 96	2 x 2 min
Etanola % 70	2 min
H ₂ O destilatua	5 min
Harris Hematoxilina	4 min
Alkohol azidoa	10 s
H ₂ O	5 min

Litio karbonatoa	10 s
H ₂ O	1 min
Eosina	1.5 min
H ₂ O	1 s
H ₂ O	2 min
Etanola % 70	2 min
Etanola % 96	2 min
Etanol absolutua	2 x 2 min
Xilola	2 x 5 min

4. taula. Alzian urdinaren tindaketa-protokoloa

Produktua	Denbora
Xilola	2 x 10 min
Etanol absolutua	2 x 2 min
Etanola % 96	2 x 2 min
Etanola % 70	2 min
H ₂ O destilatua	5 min
Alcian urdina (pH 2.5)	30 min
H ₂ O	5 min
H ₂ O	1 min
Etanola % 70	2 min
Etanola % 96	2 min
Etanola absolutua	2 x 2 min
Xilola	2 x 5 min