



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

BIOLOGIAKO GRADUA

GRADU AMAIERAKO LANA

Glifosatoaren eragina *Eisenia fetida* zizarearen digestio-hodiaren morfologian eta Azetilkolinesterasa entzimaren aktibitatean

OLATZ ARROJERIA ARANTZAZISTROKE

Leioa, 2015eko uztaila

eman ta zabal zazu



**Universidad
del País Vasco**

**Euskal Herriko
Unibertsitatea**

LABURPENA

Gaur egun produktu kimiko ugari erabiltzen dira nekazaritzaren produktibitatea emendatzeko eta modu honetan nekazaritza-produktuen etekin eta kalitatea hobetzeko asmoz. Hala ere, produktu kimiko hauek ekosisteman izan ditzaketen hilgarriak ez diren eraginak askotan ez dira kontuan hartzen. Azken urteotan osagai aktibo gisa glifosatoa duten herbiziden erabilera emendatu da. Lan honetan, glifosatoak ingurunean sor ditzakeen eraginak ikertu nahi izan dira, lurzoruan oso ugaria den *Eisenia fetida* zizarea adierazle biologiko gisa erabiliz. Esperimentuan 10 indibiduo helduz osaturiko 4 populazio erabili ziren, zeinak 14 egunez tratamendu desberdinetan ezarri ziren (kontrola, 50, 500 eta 5000 mg glifosato/Kg lur lehor). Glifosato kontzentrazio desberdinek ez zuten zizareen hilkortasunean edo pisuaren aldaketan eraginik izan. Hala ere, digestio-hodiaren epitelioaren morfologian eta azetilkolinesterasaren jardueran aldaketak behatu ziren. Glifosato kontzentrazio baxueneko ontziko zizareetan digestio-hodiko epitelioaren altueraren uniformetasun falta behatu zen, glifosato kontzentrazio ertaineko ontziko zizareetan orokorrean epitelioaren altuera txikiagoa zen, eta glifosato kontzentrazio handieneko ontziko zizareetan digestio-hodien borobiltasuna eta epitelioaren jarraitasuna galdu zen. Azetilkolinesterasaren jardueraren murrizpena behatu zen glifosatodun lurretan egondako zizareetan. Esperimentu honetan erabilitako glifosato kontzentrazioek zizareengan hilgarriak ez diren aldaketak sortzen dituzte, aztertutako biomarkatzaileak etorkizuneko ekotoxikologia testetan erabilgarriak izan daitezkeelarik.

Hitz gakoak: Glifosatoa, *Eisenia fetida*, ekotoxikologia, biomarkatzaileak, histokimika, azetilkolinesterasa

ABSTRACT

Today, a lot of chemicals are used in agriculture to increase productivity and in this way improve the quality of agricultural products. However, the sublethal effects that could have these chemicals on the ecosystem usually are not taken into account. In recent years, the uses of herbicides containing glyphosate as the active ingredient are increasing. This paper aims to investigate the effects of glyphosate using the earthworm *Eisenia fetida*, which is very abundant in soils, as a biological indicator. 4 populations of 10 adults were used in this experiment, which were exposed to different treatment for 14 days (control, 50, 500, 5000 mg glyphosate/Kg dry soil). Different concentrations of glyphosate did not have any impact on mortality or weight change on the worms. However, changes in the digestive tract epithelium morphology and acetylcholinesterase activity were observed. In the worms exposed to the lowest glyphosate concentration soil was observed lack of uniformity in the height of the digestive tract epithelium, in the worms exposed to medium glyphosate concentration soil the height of the digestive tract epithelium was generally lower, and in the worms exposed to the highest glyphosate concentration soil was observed lack of roundness and continuity of digestive tract epithelium. Reduction of acetylcholinesterase activity was observed in the worms that were

exposed to soils with glyphosate. Glyphosate concentrations used in this experiment have sublethal effects in the worms, making useful the analyzed biomarkers in future ecotoxicological tests.







Key words: Glyphosate, *Eisenia fetida*, ecotoxicology, biomarkers, histochemistry, acetylcholinesterase

SARRERA

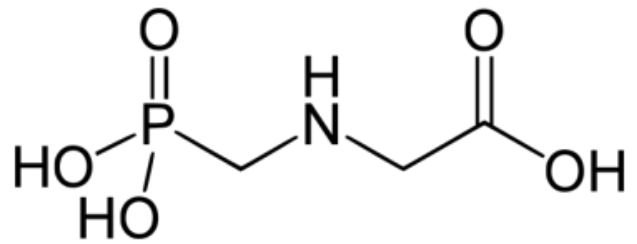
Gaur egun nekazaritzaren produktibitatearen gain faktore askok eragiten dute, eta horrekin batera mekanismo desberdinak garatu izan dira uzta babestu eta nekazaritza-produktuen etekin eta kalitatea hobetzeko asmoz. Populazio orokorrarentzat “belar txar” bezala ezagutzen dena, nahi ez den lurzoruetan hazten den eta uzta eragin negatiboa duen landare multzoa da, uztari ur, elikagai eta espazioa kenduz. Belar txarren hazkuntza modu desberdinetan kontrola daiteke: modu mekaniko, biologiko zein kimikoan. Gaur egun, herbiziden bidezko kontrol kimikoa da gehien erabiltzen dena. Honela, landare kaltegarrien hazkuntza eta garapena inhibitu edo oztopatzea lortzen da (Monaco et al., 2002).

Herbizida mota desberdinak daude, eta hauen sailkapenerako irizpide desberdinak jarraitu daitezke (1. Taula) (Rosales-Robles & Sánchez de la Cruz, 2006). **Produktua aplikatzerako garaia** **arabera hozitze aurretikoa** edo **ondorengoa** izan daiteke. **Hautakortasunaren arabera** **hautakorrak** edo **orokorrak** izan daitezke. Hautakorrak diren herbizidek landare jakinen ezabaketa eragiten dute, inguruko landareei nabarmenki eragin gabe. Herbizida orokorrak kultibo gabeko lurzoruetan edo ezabatu nahi diren landare jakinetan ezarri behar dira, euren toxikotasunak edozein landareren gain eragin dezakete. **Eragin motaren arabera** **ukipenezkoak** edo **sistematikoak** izan daitezke; lehenengo motakoek kontaktu bidezko ezabapena eragiten dute, bigarrenak lur edo hostoetan aplikatu daitezke mugikorrek baitira landarean zehar. Aipatutako sailkapenen arabera herbizidaren aukeraketa egin daitekeen arren, **landarean bertan sortzen dituzten aldaketen arabera**ko sailkapena da zehatz eta erabilgarriena; batzuk *hazkuntzaren erregulatuzaileak* dira, edo *plantularen hazkuntzaren inhibitzaileak*, *fotosintesiaren inhibitzaileak*, *pigmentuen sintesiaren inhibitzaileak*, *lipidoen sintesiaren inhibitzaileak*, *aminoazidoen sintesiaren inhibitzaileak* edo *mintz plasmatikoen suntsitzaileak*.

1. Taula Herbiziden sailkapenerako irizpideak (Rosales-Robles & Sánchez de la Cruz, 2006-tik moldatua).

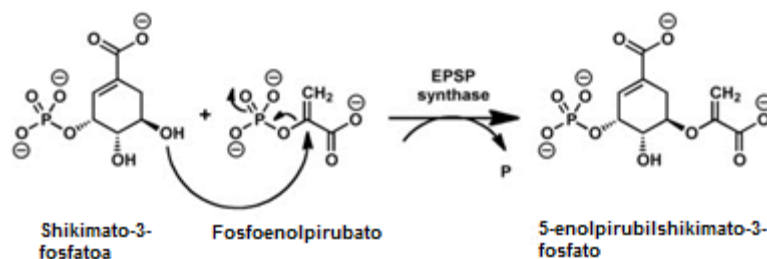
Aplikatzeko garaia	Hozitze aurretikoa 		Hozitze ondorengoa 	
Hautakortasuna	Hautakorra 		Orokorra 	
Eragin mota	Ukipenezkoa 		Sistematikoa 	
Landarean eragindako aldaketa	<i>Hazkuntzaren erregulatuzailea edo Plantularen hazkuntzaren inhibitzailea</i>		<i>Pigmentuen sintesiaren inhibitzailea</i>	
	<i>Fotosintesiaren inhibitzailea</i>		<i>Lipidoen sintesiaren inhibitzailea</i>	
			<i>Aminoazidoen sintesiaren inhibitzailea</i>	
			<i>Mintz plasmatikoen suntsitzailea</i>	

Azken urteotan osagai aktibo gisa glifosatoa duten herbiziden erabilera emendatu da (Costa-Vilamajó et al., 2011; Kiely et al., 2011). Glifosatoa glizina aminoazido naturalaren aminofosfato analogoa da [gli(zina) fos(fon)ato] (1.Irudia). Espektrio zabaleko herbizida orokorra da, landareek lurzorutik edo hostoetatik xurgatzen dutena. Glifosatoak 5-enolpirubilshikimato-3-fosfato sintasa (EPSPS) entzima inhibitzen du azido shikimikoaren bidezidorrean, honela aminoazido desberdinen (fenilalanina, tirosina eta triptofano) sintesia blokeatuz (Monaco et al., 2002).



1.Irudia Glifosatoaren egitura. IUPAC izena: *N*-fosfonometil glizina (C₃H₈NO₅P) (Cox, 2004).

EPSPS zelularen nukleoan sintetizatzen da eta ondoren kloroplastora garraiatzen da proteina-garraiatzaile baten bidez, bertan azido shikimikoaren bide metabolikoan parte hartzen duelarik (DellaCioppa et al., 1986). Kloroplastoan, EPSPS entzima shikimato-3-fosfatoarekin (S3P) lotzen da, gero fosfoenolpirubatoa (PEP) lotzen delarik entzimaren gune aktibora. Egoera honetan, EPSPS entzimak kondentsazio erreakzio bat katalizatzen du 5-enolpirubilshikimato-3-fosfato (EPSP) sintetizatzeke (2.Irudia). EPSP proteina oinarriko hiru aminoazido aromatikoaren sintesirako beharrezkoa da (fenilalanina, tirosina eta triptofano), baita bide metaboliko honekin erlazionatuta dauden beste bidezidor batzuen produktu diren molekulen sintesirako ere (besteak beste, lignina) (Franz et al., 1997).

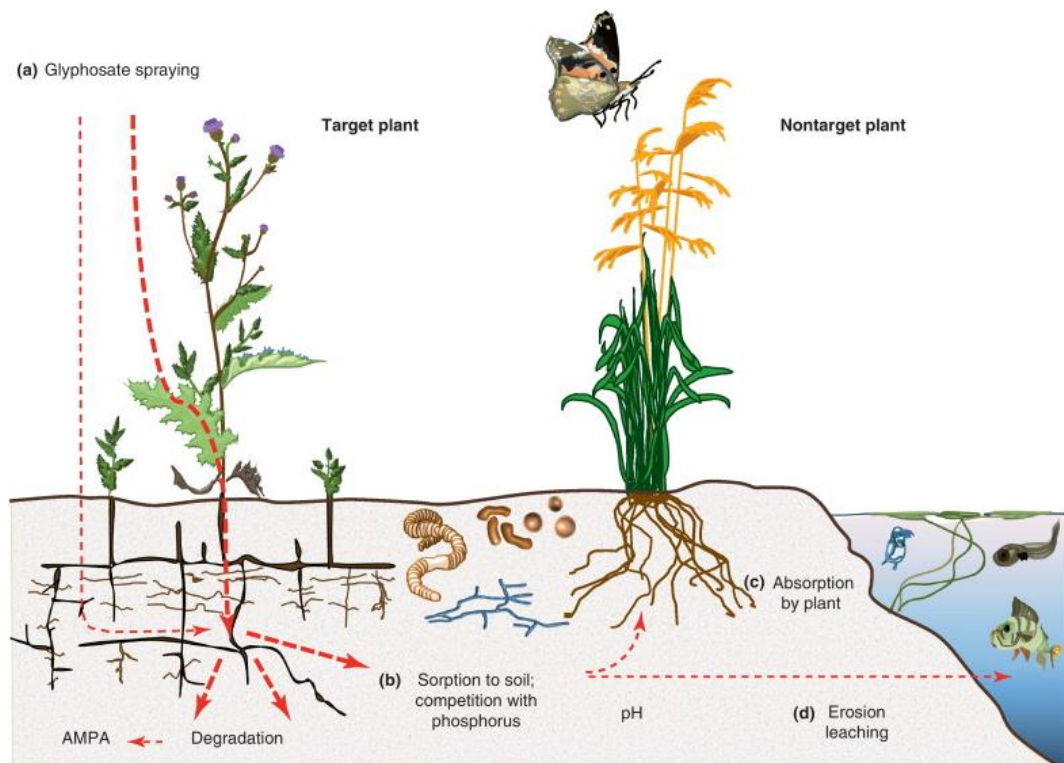


2.Irudia EPSPS entzimak katalizatzen duen 5-enolpirubilshikimato-3-fosfato sintetizatzeke kondentsazio erreakzioa. Kondentsazio erreakzio bat, kimika organikoan, bi molekula konbinatzean datza produktu bakar bat emanez, ur molekula baten sorrerarekin batera (S3P + PEP → EPSP + H₂O) (Schönbrunn et al., 2001).

Glifosatoaren eta PEP molekularen egiturak oso antzekoak dira; hori dela eta, glifosatoak inhibitzaile lehiakor moduan jokatu du, shikimato-3-fosfato eta EPSPS entzimak osatutako konplexuaren gune aktibora lotuz. Modu honetan, ezin izango da 5-enolpirubilshikimato-3-fosfatoa sintetizatu, honetarako beharrezkoa den PEP ezin baita EPSPS entzimaren gune aktibora atxiki. Honek, aminoazido aromatikoaren sintesia blokeatzea eragingo du, baita shikimatoaren kontzentrazioaren emendioa ere, maila toxikoetara heltzeraino (Duke, 1990). Egoera hau landare osoan zehar zabalduko da, glifosatoa landare zeluletan zehar garraiatzen baita (garraio sinplastikoa), azkenik landarearen heriotza eraginez (Laerke, 1995).

Azken urteotan nekazaritzan gehien erabiltzen den herbizida da (Costa-Vilamajó et al., 2011; Kiely et al., 2011). Zenbait ikerketen arabera, glifosatoa herbizida eraginkorrenetakoa izateaz gain, ingurumenean sor ditzakeen arazoak minimoak direla proposatu da (Giesy et al., 2000; Duke & Powles, 2008; Costa-Vilamajó et al., 2011). Izan ere, kimikoki eta fisikoki glifosatoa naturan agertzen diren substantzia askoren antzekoa da, erraz ionizatzen da eta anioi moduan materia organikora atxikitzen da, lurzoruan ia mugiezin bihurtuz. Hala ere, beste zenbait ikerketen arabera pentsatzen dena baino eragin negatiboagoak izan ditzakeela ikusi da, glifosatoa bere propietate fisikokimikoengatik lurzoruan oso mugikorra ez bada ere, uretan oso disolbagarria da eta modu honetan garraia daiteke lurzoru berrietara (Kolpin et al., 2006; Scribner et al., 2007; Battaglin et al., 2008).

Glifosatoa ezabatu nahi den landarearen hostoetan ezartzen da (3a.Irudia). Landareek hostoetatik xurgatzen dute eta garraio sinplastiko bidez landare osoan zehar barreiatzen da. Landarearen heriotza eragin ondoren materia organikoan bertan metatuta gera daiteke, edota lurzorura askatu (Helander et al., 2012) (3b.Irudia). Lurzoruan glifosatoaren degradazioa prozesu biologiko desberdinen bidez gertatzen da, zeinetan mikroorganismo desberdinek hartzen duten parte; hala ere, *Pseudomonas* bakterioaren jarduera da garrantzitsuena (Borggaard & Gimsing, 2008). Bi bidezidor metaboliko desberdinetan zehar gerta daiteke glifosatoaren degradazioa, baina azido aminometilfosfonikoa (AMPA) metabolitoa produktu duen bidezidorra da ezagunena.



3.Irudia Glifosatoaren ibilbidea ingurunean. (a) Landarearen hostoetan ezartzen da, ondoren landarean zehar barreiatuz. (b) Degradatu ez den glifosatoa lurreko partikulei atxiki daiteke. (c) Inguruko landareek sustraietatik xurga dezakete lurzoruan metatutako glifosatoa. (d) Lixibiazio bidez gainazaleko uretara hel daiteke, ekosistema desberdinetara zabalduz (Helander et al., 2012).

Degradatzen ez den glifosatoa lurzoruko partikula organikoetara atxiki daiteke (3b.Irudia), bertan ia mugiezin bihurtuz; hala ere, lurzoru motak atxikitze- eta degradatze-prozesuak baldintza ditzake. Lurzoruaren pH eta fosfato kontzentrazioa baxua denean, glifosatoaren berehalako degradazio ahalmena murrizten da (Mamy et al., 2005), lurzoruko partikuletara errazago atxikitzen baita. Izan ere, lurzoruaren pHak glifosatoaren karga elektrikoa baldintzatzen du, modu honetan lurzoruko partikuletan atxikigarri eginez; bestalde, lurzoruko fosfatoek glifosatoarekin lehiatzen dute partikulekin atxikitzerakoan, zenbat eta fosfato gehiago egon orduan eta glifosato aske gehiago egotea eraginez (Vereecken, 2005). Glifosatoak konplexu sendoak era ditzake pH basikoa den lurzorueta, metal dibalenteekin ligando gogorrak eratuz (Jayasumana et al., 2014). Honek biodegradazioa moteltzea eragiten du, denbora luzez glifosatoa uretan garraiarri izatea ahalbidetuz.

Glifosatoa uretan disolbatuta garraia daiteke ekosistema desberdinetara ingurunetik erabat ezabatzen den artean. Modu honetan, landare desberdinen eragin dezake, eta baita aminoazido aromatikoak sintetizatzeke azido shikimikoaren bidezidorra beharrezkoa duten mikroorganismoetan ere.

Lurzoruko ornogabe ugariena lur-zizarea izanik, ikerketak egin izan dira glifosatoak zizareengan izan dezakeen eragina ikertzeko asmoz. Ikusi da 50000 mg glifosato/Kg kontzentrazioa hilgarria dela zizare helduentzat, baita 5000 mg glifosato/Kg kontzentraziopean zizare-kumeen bideragarritasuna asko murrizten dela ere (García-Torres et al., 2014). Beste ikerketa batean behatu da zizareen pisu galera glifosato kontzentrazio eta esposizio-denborarekin guztiz erlazionatuta dagoela (Correia & Moreira, 2010).

Hala ere, herbizidek, aipatutako lanetan eta gure lanean kontuan hartu ez diren osagai gehigarriak izaten dituzte (surfaktanteak). Surfaktante molekulek talde hidrofobiko eta hidrofiliakoak dituzte. Ezaugarri honek, soluzio akuosotan egitura bereziak eratzea eragiten du, aire eta uraren artean azalera tentsioa murriztuz. Honek, osagai aktiboaren efizientzia handitzea eragiten du eta produktu kimikoaren toxikotasuna emendatzen da (Rubin, 1997).

Beraz, produktu kimikoek uztan kalteak sor ditzaketen eragileei aurre egiteko balio badute ere, hauen gehiegizko erabilerak lurzoru eta uren kutsadura eragin dezake, organismo desberdinei eta ekosistemari kalteak sortuz (Kolpin et al., 2006).

Lurzoruen kutsadura eta kalitatea neurtzeko edo estimatzeko, adierazle mota desberdinak erabil daitezke: fisikoak, kimikoak edota biologikoak (USDA, 2015). Adierazle fisikoak lurraren egoera fisikoaren berri ematen diguten ezaugarriak dira, hala nola, partikula solidoen eta poroen tamaina,

lurzoruaren sakontasuna eta lurzoruaren konposizioa. Beste alde batetik, lurzoruaren pHa, gazitasuna, materia organiko kantitatea, fosforo kontzentrazioa, katioi elkartruke ahalmena, elikagaien zikloa eta elementu kutsakorren kontzentrazioa (metal astunak, herbizidak, etab.) izan daitezke, besteak beste, adierazle kimikoetariko batzuk. Lurzoruko organismoak azter daitezke kutsatzaileen presentzia antzemateko adierazle biologikotzat, kutsatzaileek organismo hauen aktibitatean eta jokaeran eragin baitezakete.

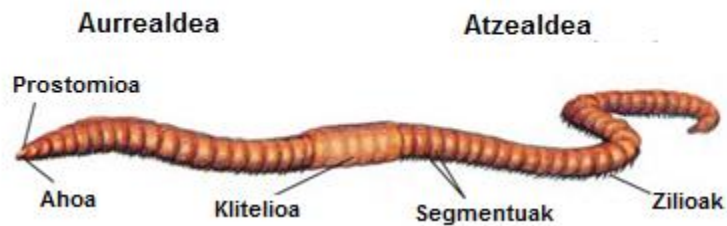
Kutsatzaileek organismo desberdinengan duten eragin zuzena ikertzea da kutsatzaile hauek ekosisteman sor dezaketen kaltea aztertzeko modu egokiena. Lurzoruaren kutsaduraren adierazle moduan organismo desberdinak erabil daitezke. Adierazle erabilienetakoa lur-zizarea da, izan ere, lurzoru bizi diren ornogabe guztien biomasaren %80 baino gehiago osatzen du (Yasmin & D'Souza, 2007), edafogenesia (lurzoruaren eraldaketan) parte hartzen duen organismo garrantzitsuenetarikoa izanik (Bartlett et al., 2010). Besteak beste, zizareek materia organikoaren mineralizazioa eta humus sorrera emendarazi dezakete (Emmerling & Paulsch, 2001). Gainera, lurzoru kutsatzaileak euren ehunetan metatzeko gaitasuna dute, lurzoruaren kutsadura maila eta kalitatearen neurketa erraztuz (Yasmin & D'Souza, 2010).

Modu desberdinetan barnera ditzakete kutsatzaileak zizareek. Lurzoruko urarekin zuzeneko kontaktuan daude, eta beraz, baita bertan disolbatuta dauden kutsatzaileekin ere. Zizareen larruazala oso iragazkorra da eta modu honetan disolbatutako kutsatzaile ugari xurga ditzakete (Jager et al., 2003). Bestalde, lurzoru kopuru handiak irensten dituzte, etengabe barneratzen dituztelarik partikula solidoei loturiko kutsatzaileak euren digestio-hodira (Morgan et al., 2004).

Gainera, lur-zizareak beste animalia askoren elikagai iturri nagusienetarikoak dira, besteak beste, anfibio, narrasti, hegazti eta zenbait ugaztunena. Hori dela eta, kutsatzaile kimikoen biometaketak kutsatzaileak maila trofiko altuagoetara transferitzeko arriskua ekar lezake (Mariño et al., 1992).

Ekotoxikologian askotan erabiltzen den lur-zizare espeziea *Eisenia fetida* (Savigny, 1826) da (4. Irudia). Zizare gorri bezala ere ezagutzen den espezie honek zenbait ezaugarri betetzen ditu laborategian hazi ahal izateko eta honela prozedura esperimentalak errazteko; besteak beste, ugaltze-tasa altua du (Schuldt, 2008). Izan ere, heldutasun sexuala jaio eta 2-3 hilabete buruan eskuratzen du, 7-10 egunetan batez beste 10 arrautza dituen kapsula bat kanporatzen du eta hauen eklosioa 14-21 eguneko inkubazio ondoren gertatzen da. Honez gain, temperatura tarte zabalak onartzen ditu (15-25°C), migrazio joera baxua du eta populazio handitan bizitzeko gai da (40-50 mila indibiduo/m²) (Chacón-Díaz & Blanco-Rodríguez, 1999).

LUR-ZIZARE GORRI HELDUA (*Eisenia fetida*)



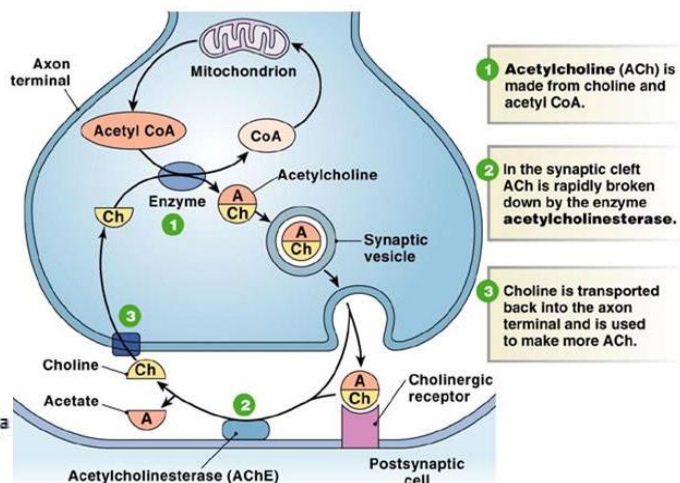
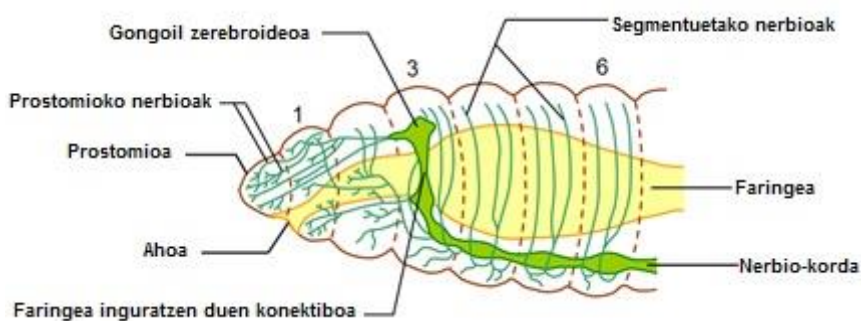
4. Irudia *Eisenia fetida* (Savigny, 1826).

Sailkapena (NCBI): Erreinua: *Animalia* **Phylum:** *Annelida* **Klasea:** *Clitellata* **Subklasea:** *Oligochaeta* **Ordena:** *Haplotaxida* **Familia:** *Lumbricidae* **Generoa:** *Eisenia*

Substantzia toxikoen presentziaren adierazle nabariak zizareen hazkuntza eta ugalketaren murrizpena dira (Yasmin & D'Souza, 2010). Hala ere, badaude beste parametro batzuk ekotoxikologia testetarako erabil daitezkeenak. Hauen artean biomarkatzaileak daude, osasunaren egoera aztertzeko balio duten parametro biologikoak (ZTH, 2003). Biomarkatzaileak aldaketa biokimiko, zelular, fisiologiko edo portaera aldaketak dira, zeintzuk ehun edo gorputzeko fluido laginetan neur daitezkeen eta kutsatzaileraren baten esposizioaren adierazle diren (Depledge, 1994). Ikerketa honetan, glifosatoak zizareengan duen eragina aztertuko da, biomarkatzaile moduan hestearen aldaketa morfologikoak eta azetilkolinesterasa aktibitatea erabiliz.

Zizareen digestio-hodiaren morfologiari dagokionez, aldez aurretik burututako zenbait ikerketek erakutsi dute glifosatoaren esposiziopean, zenbait aldaketa behatu izan direla (Morowati, 2000), non 14 eguneko esposizioaren ondoren, digestio-hodiko epitelioko zelula askoren heriotza behatu izan da, hodiaren morfologia aldatuz.

Azetilkolinesterasa (AChE) nerbio sistemako entzima da, zeinak azetilkolina neurotransmisorearen hidrolisia katalizatzen duen nerbio bulkadari amaiera emanez (5b. Irudia). Azetilkolinesterasa aktibitate altuena zizarearen klitelo aurreko zatian neurtu izan da, entzima honek prostomiotik hurbil kokatzen den zerebro dortsalean duen garrantzia erakutsiz (5a. Irudia) (Calisi et al., 2011). AChE aktibitatea murrizteak azetilkolinaren metaketa eragiten du, hiperaktibitatea sortuz, eta ondorioz, nerbio eta muskulu sistemen disfuntzioa eraginez. Kutsaduraren aurrean, zizareetan, azetilkolinesterasa entzimaren aktibitatea murrizten dela erakutsi dute zenbait ikerketek (Calisi et al., 2011).



5. Irudia (a) Zizarearen burualdeko nerbio sistema zentralaren eskema. (b) Azetilkolinerasaren aktibitatea neuronen arteko sinapsian nerbio bulkadari amaiera emanez (Kalman & Lang, 2008).

Lan honen helburu nagusia aipatutako bi biomarkatzaileak kutsaduraren adierazle egokiak diren ikertzea da, era berean, glifosatoak zizareengan hilgarriak ez diren zer nolako eraginak dituen aztertuz.

MATERIALAK ETA METODOAK

Diseinu esperimentalak

Esperimentu hau egiteko lurzoru artifiziala erabili zen, zeina OECD protokoloa jarraituz prestatu zen (2.Taula) (OECD, 1984). Ekotoxikologia testetarako gehien erabiltzen den lurzoru estandarizatuaren osagai nagusia harea da; kaolinita silikato geruzadun buztinezko minerala da; zohikatza lurzoru materia organikoaren ordezkari da; eta kaltzio karbonatoak lurraren pH egonkortzea ahalbidetzen du (pH 6-6.5). Glifosato kontzentrazio desberdinen eragina ikertzeko 4 ontzi ezberdin prestatu ziren, bakoitzean 750 g lur heze eta glifosato kontzentrazio desberdina zegoelarik (3.Taula). OECD lurrak ur erretentzio gaitasun maximoaren %40an hezatu ziren, kontrolaren kasuan beharrezko ur distilatua gehituz eta beste kasuetan gehitu beharreko uretan glifosatoa disolbatuz.

2.Taula Lurzoru artifizialaren osagaiak (OECD, 1984).

Lur artifizialaren osagaiak		
750 g (pisu hezea)	WHC = %21,91	WHC = %40
Ura (mL)		66
Lur lehorra (g)		684
	Harea	478,8
	Kaolinita	136,8
	Zohikatza	68,4
	CaCO ₃	0,684

3.Taula Tratamendu bakoitzean ezarritako glifosato kontzentrazioa.

Tratamendua	Glifosato kontzentrazioa (mg x Kg ⁻¹ lur lehor)
Kontrola (C)	0
Baxua (L)	50
Ertaina (M)	500
Altua (H)	5000

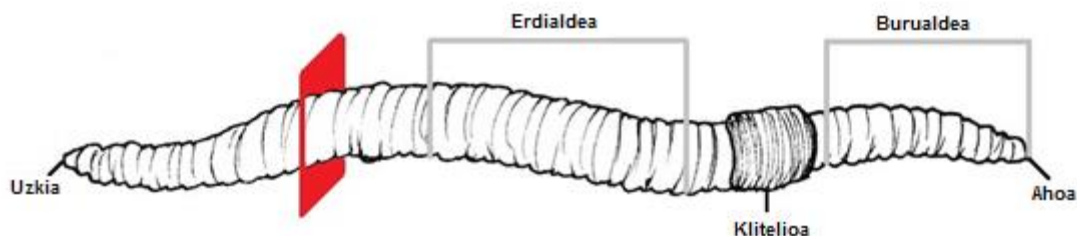
300-600mg bitarteko *Eisenia fetida* 40 indibiduo klitelodun (helduak) erabili ziren esperimentuan, Euskal Herriko Unibertsitateko Zientzia eta Teknologia Fakultatean hazitakoak. Aldez aurretik

prestatutako lur artifizialean (OECD lur garbia) aklimatatzen utzi ziren 24 orduz, ilunpean eta 20°C inguruko giroan, esperimentuari hasiera eman aurretik. Egokitze-denbora igaro ondoren, zizareak hamarnako populazioetan banatu, populazioka pisatu eta tratamendu-lurretan sartu ziren. Esposizio-denbora 14 egunekoa izan zen, argipean (zizareak lurzoruan barnera zitezten) eta 20°C inguruko giroan (6. Irudia).



6. Irudia Diseinu esperimentalak: esposizio-denbora 14 egunekoa izan zen, argipean eta 20°C-tan. Ontzi bakoitzean glifosato kontzentrazio desberdina zegoen; **C** (kontrola) 0 mg glifosato x Kg⁻¹ lur-lehor, **L** (baxua) 50 mg x Kg⁻¹, **M** (ertaina) 500 mg x Kg⁻¹ eta **H** (altua) 5000 mg x Kg⁻¹.

Esposizio-denbora amaituta tratamendu bakoitzeko zizareak batera pisatu ziren, beraien pisuaren aldaketa neurtu ahal izateko. Ondoren analisi desberdinetarako prestatu ziren zizareak, intereseko bi zatitan banatuz (7. Irudia): erdialdea eta burualdea.



7. Irudia *Eisenia fetida* espeziearen irudi eskematikoa: gorritz zehar-ebakia eta grisez analizatutako eremu anatomikoak.

Digestio-hodiko behaketa eta neurketa histologikoak

Zizareen digestio-hodiaren behaketa eta neurketa histologikoak burutzeko, zizareen erdialdeko zatiak aukeratu ziren. Laginak formalina %10tan (formaldehidoaren %4ko disoluzioa fosfato tanpoian) fixatu ziren. Fixapenak zelulen eta ehunen egitura eta konposizioa bere horretan mantentzea ahalbidetzen du, ondoren egitura hauen behaketa eta ikerketak egin ahal izateko (Fox et al., 1985).

Laginak fixatuta, hauek deshidratatu ziren ehun-prozesadore automatiko baten laguntzaz, non laginak alkohol kontzentrazio geroz eta altuagotan murgildu ziren (%70, %80, %90 eta %100), azkenik lagineko ur guztia alkoholez ordezkatu arte. Prozesu hau beharrezkoa da ondoren hidrofobikoa den parafina laginean sartu ahal izateko. Laginak parafinan sartu aurretik xilolean barneratu ziren. Parafina 47-64°C-ko urtze-puntua duen argizaria da, likido egoeran barneratzen da laginetan eta giro

temperaturan solidotu egiten da matrize sendo bat eratzuz, ehunak apurtzea ekiditeko (Spencer & Bancroft, 2013). Beraz, laginak deshidratatu ondoren, parafina likidoan sartu ziren.

Azkenik, parafina ebaketa-takoak prestatu ziren laginen zehar-ebakiak (7. irudia) egin ahal izateko. Ebakiak (5µm lodiera) mikrotomo bidez egin ziren. Ondoren, ebaki hauek hematoxilina/eosina tindatzaileez tindatu ziren hurrengo protokoloa jarraituz (4. Taula).

4.Taula Hematoxilina/Eosina tindaketaren protokoloa.

Produktua	Denbora
Xilola	2 x 10 minutu
%100ko etanola	2 x 2 minutu
%96ko etanola	2 minutu
%70ko etanola	2 minutu
Ura	5 minutu
Harris Hematoxilina	4 minutu
Ur distilatua	2 minutu
Ur distilatua	3 x 10 segundo
Alkohol azidoa	10 segundo
Ura	5 minutu
Litio karbonatoa	10 segundo
Ur distilatua	1 minutu
%70ko etanola	3 minutu
%80ko etanola	1 minutu
Eosina	1 minutu
%96ko etanola	2 x 2 minutu
%100ko etanola	2 x 2 minutu
Xilola	2 x 2 minutu

Digestio-hodiko epitelioko aldaketak neurtzeko ImageJ (National Institute of Health, USA) programa erabili zen. Epitelioaren altuera kalkulatzeko digestio-hodiaren perimetro eta azalera neurtu ziren, epitelioren kanpo aldetik eta barne aldetik. Digestio-hodiak borobilak zirela suposatuz (tiflosolea kontuan hartu gabe) eta borobil baten azalera ($=\pi r^2$) jakina izanik, kanpo eta barne erradioak kalkulatu ziren. Kanpo eta barne erradioen kenketa eginez neurtu ziren digestio-hodiko epitelioren

altuerak. Tiflosoleak digestio-hodian betetzen zuen azalera kalkulatzeko, tiflosolearen azalera eta digestio-hodiaren azalera totalaren arteko zatiketa egin zen.

Azetilkolinesterasaren detekzio histokimikoa

Neurketa histokimikoak egiteko zizareen burualdeak erabili ziren. Lagin hauek nitrogeno likidoan izoztu ziren (-116°C). Izozketa metodo honekin lagina berehala izozten da, egiturak kimikoki fixatu gabe entzimen aktibitatea mantenduz. Laginak izoztuta mantendu ziren izozkailuan. Zehar-ebakiak kriostato bidez ebaki ziren (10µm lodiera) eta toluidina urdina erabili zen ebaki hauek tindatzeko eta gongoil zerebroidea detektatzeko. Ondoren, gongoil zerebroidea konfirmatuta zegoela, bigarren ebaki bat eskuratu zen kriostatoan eta hurrengo protokoloa jarraituz azetilkolinesterasa jarduera histokimikoa ikustarazi zen (UNMS, 1998). Horretarako, lehendabizi inkubazio soluzioa prestatu zen (5. Taula). Soluzioa 37°C-ko bainuan aklimatatzen utzi zen 15 minutuz, ondoren tindatu beharreko portak barneratu ziren tindaketa-soluzioan eta 37°C-tan utzi ziren 60 minutuz. Denbora igaro zenean, portak ur distilatutik pasatu ondoren, Baker (pH 7.0) soluzioan barneratu ziren 10 minutuz.

5.Taula Azetilkolinesterasa histokimikoki detektatzeko soluzioa (UNMS, 1998).

Erreaktiboa	Kantitatea
Azetil tiokolina ioduroa	25mg
0,1M Azetato tanpoia (pH 6.0) 3H ₂ O (13,6g/L)	32,5mL
0,1M Sodio zitrato 2H ₂ O (2,94g/100mL)	2,5mL
30mM kupre sulfato 5H ₂ O (0,65mg/100mL)	5mL
Ur distilatua	5mL
5mM Potasio ferrizianida (0,165g/100mL)	5mL

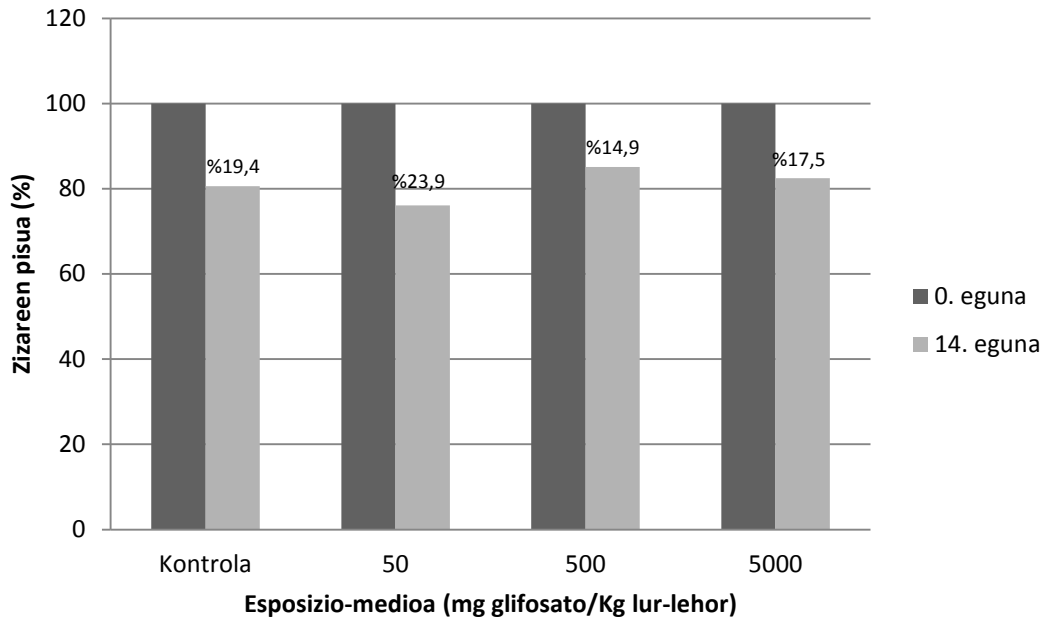
Azetilkolinesterasa aktibitatea neurtzeko “ImageJ” programa erabili zen. Horretarako, gongoil zerebroideoen irudiak argi intentsitate eta handipen berdinarekin eskuratu ziren. Azetilkolinesterasa aktibitatea gongoil zerebroideoko gris intentsitatea neurtuz kalkulatu zen.

Analisi estatistikoak

Taldeen arteko konparaketak ANOVA bidez analizatu ziren, tratamendu barneko eta ondorengo konparaketak Tukey test bidez egin ziren. Beste alde batetik, pisuaren galeraren analisi estatistikorako z-score testa aplikatu zen. Estatistika esangarritasuna $p < 0.05$ ean ezarri zen.

EMAITZAK

Esposizio-denbora igaro ondoren erabilitako glifosato kontzentrazioek ez zuten zizareengan hilkortasunik eragin eta erabilitako 40 indibiduoak bizirik eskuratu ziren.



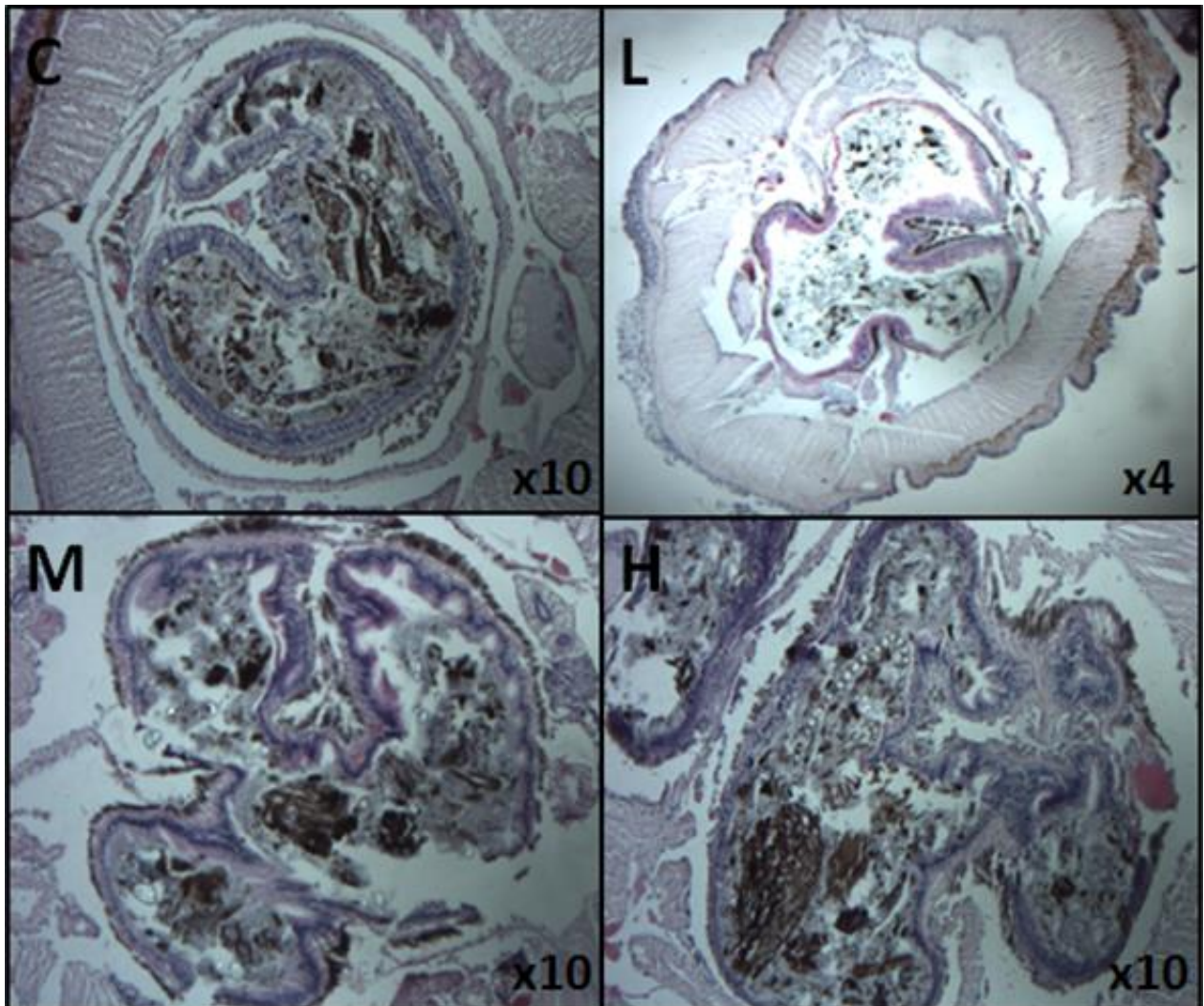
8. Irudia Esposizio-medioaren arabera zizareen pisu aldaketa.

Pisu galera lau populazioetan gertatu zen. Glifosatorik gabeko lurretan (Kontrol) egondako populazioaren pisu galera %19.4koa izan zen. Jaitsiera handiena glifosato kontzentrazio baxueneko lurretan egondako populazioan neurtu zen, jaitsiera hau %23.9koa izan zelarik. Beste bi tratamenduetako zizare-populazioen pisu galera kontrol-ontzian egondakoarena baino baxuagoa izan zen, %14.9 (Ertaina) eta %17.5 (Altua) (8. Irudia). Hala ere, taldeen artean ez zen desberdintasun esangarririk aurkitu.

Digestio-hodiko behaketa eta neurketa histologikoak

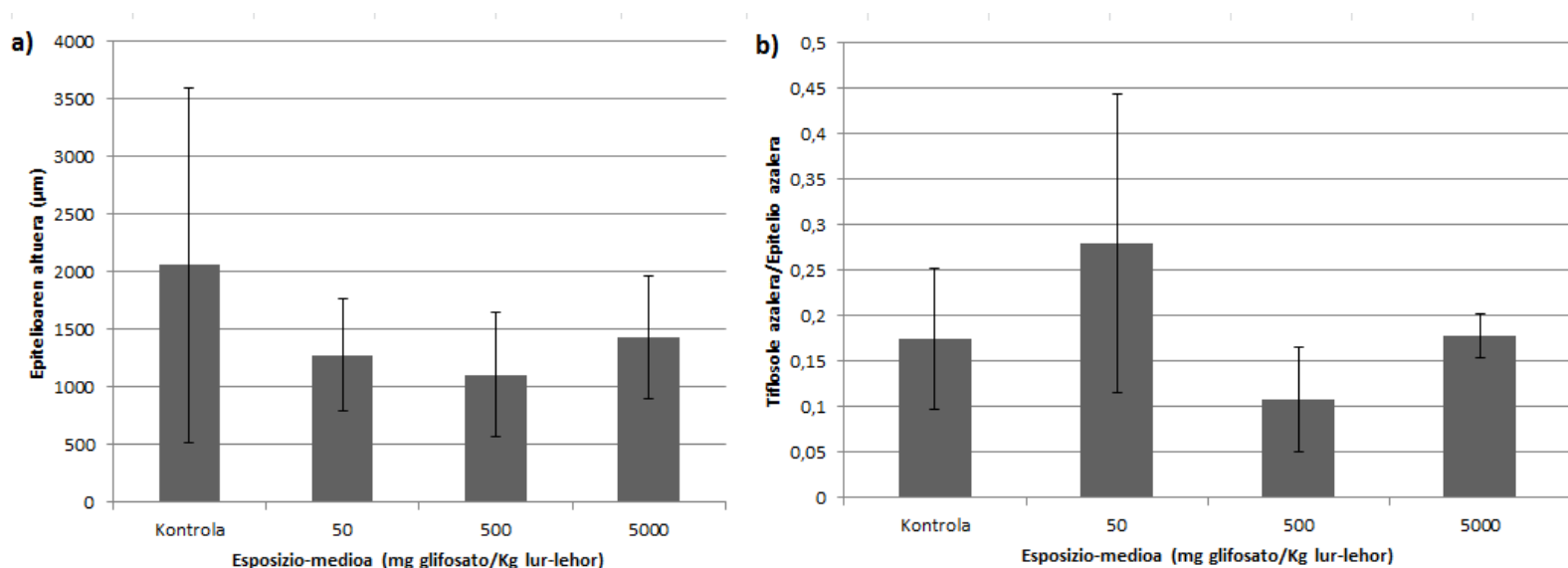
Zizareen digestio-hodiaren irudi histologikoen behin behineko behaketek erakutsi zuten glifosatoak zuzenean eragin zezakeela digestio-hodiaren formaren aldaketan (9. Irudia). Kontrol-ontzian egondako zizareen digestio-hodia nahiko borobila izan zen orokorrean, digestio-hodiko epiteliaren altuera ere nahiko uniforme mantenduz hodi guztian zehar. Glifosato kontzentrazio baxueneko ontziko zizareetan aldaketa nabarmenena digestio-hodiko epiteliaren altueraren uniformetasun faltan behatu zen, handiagoa izanik tiflosolea osatzen duen epiteliaren altuera. Glifosato kontzentrazio ertaineko ontziko zizareetan ikusi zen orokorrean digestio-hodiko epiteliaren altuera

txikiagoa zela. Glifosato kontzentrazio handieneko ontziko zizareetan digestio-hodien borobiltasuna eta epitelioaren jarraitasuna galdu zela behatu zen.



9. Irudia Zizareen digestio-hodiaren zehar-ebakien irudi histologikoak; kontrola (C), 50mg glifosato/Kg lur-lehor (L), 500mg glifosato/Kg lur-lehor (M) eta 5000mg glifosato/Kg lur-lehor (H).

Digestio-hodiko epitelioaren altueraren inguruan egindako neurketei dagokienez, ikusi zen kontroleko zizareen epitelioa altuagoa zela. Epitelio baxuena glifosato kontzentrazio ertaineko ontzian egondako zizareetan behatu zen. Glifosato kontzentrazio altueneko ontzian egondako zizareen digestio-hodiko epitelioaren altuera, glifosatodun beste bi ontzietan egondakoena baino altuagoa izan zen. Emaidza hauek ez dira esangarriak ($p > 0.05$), tratamendu bakoitzeko zizareen artean aldakortasuna handia behatu zelako (10a. Irudia).

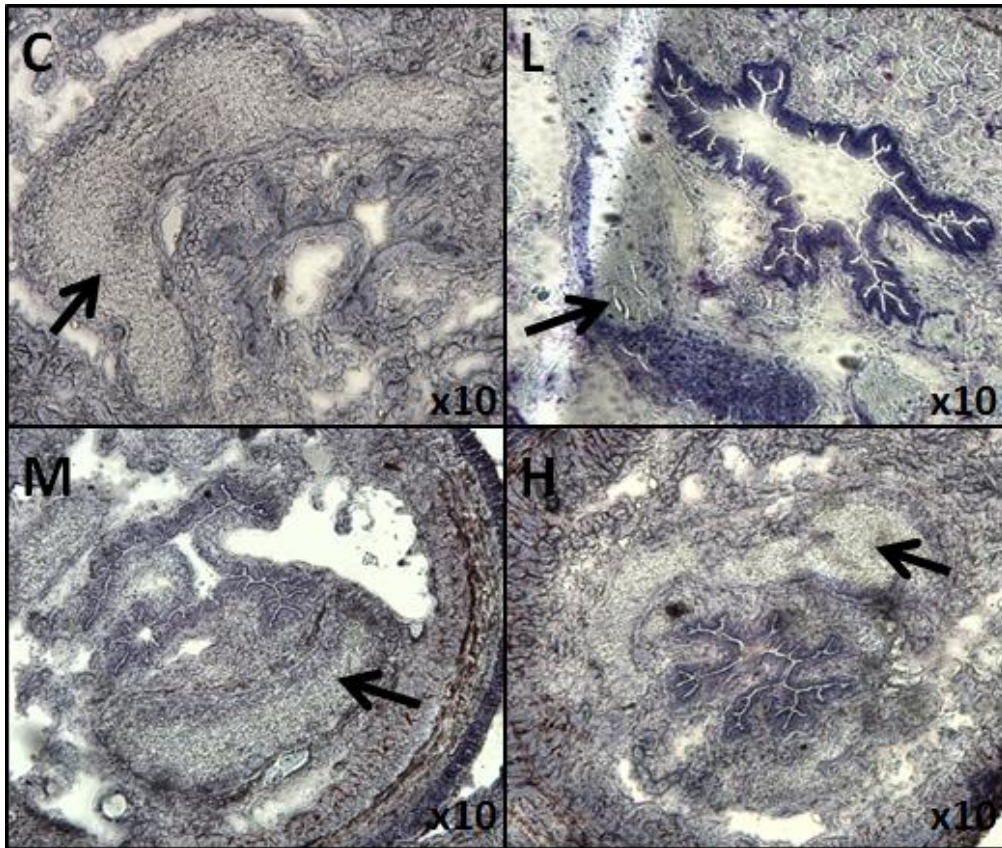


10. Irudia Esposizio-medioaren arabera (a) digestio-hodiko epitelioaren altuera, eta (b) tiflosolearen azalera eta epitelioaren azaleraren arteko erlazioa.

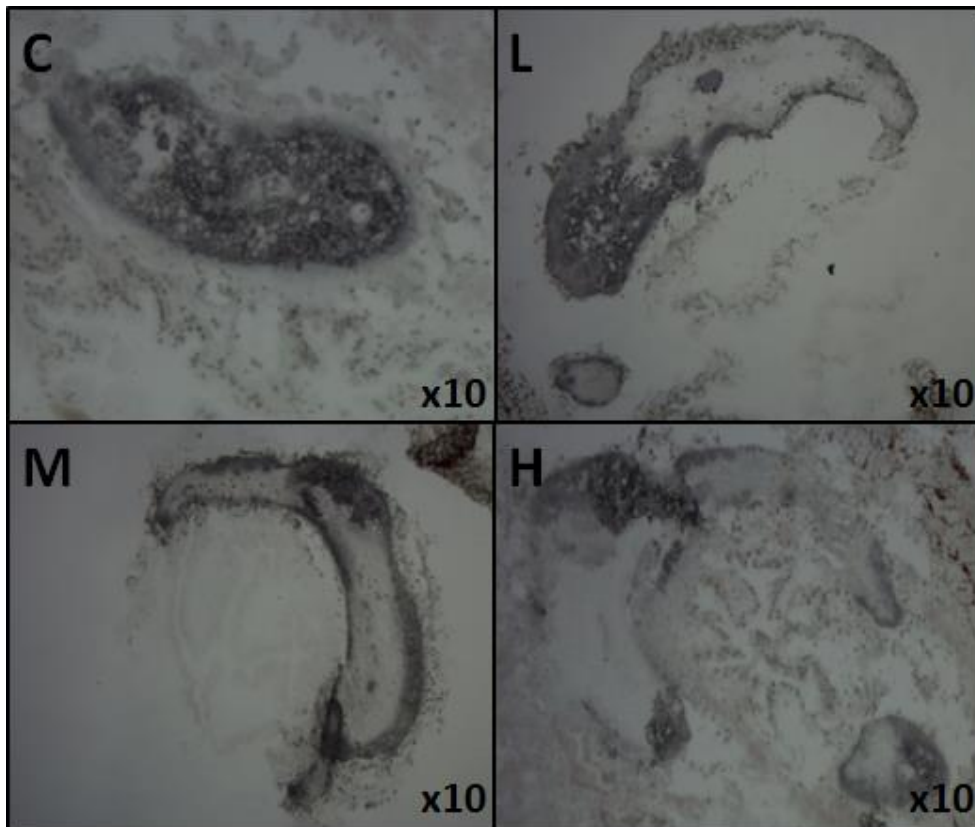
Tiflosole azalera eta epitelio azaleraren arteko erlazioaren bidez neurtu zen tiflosoleak digestio-hodian betetzen zuen azalera. Kontrolako eta kontzentrazio handieneko ontziko zizareetan, batez bestekoz, tiflosoleak antzeko azalera betetzen zuen digestio-hodiaren azalerarekiko. Glifosato baxueneko ontzian egondako zizareetan tiflosolearen tamaina handiagoa zela neurtu zen orokorrean. Bestalde, glifosato kontzentrazio ertaina zuen ontziko zizareen tiflosolea txikiagoa zen batez bestekoz. Hala ere, emaitza hauek ez dira estatistikoki esangarriak ($p > 0.05$); izan ere, tratamenduko zizare desberdinetan lortutako neurriak oso aldakorrak izan ziren euren artean (10b. Irudia).

Azetilkolinesterasaren detekzio histokimikoa

Zizareen gongoil zerebroideoen behin behineko behaketek erakutsi zuten glifosatoak ez zuela eragin nabarmenik izan honen morfologiaren aldaketan (11. Irudia).



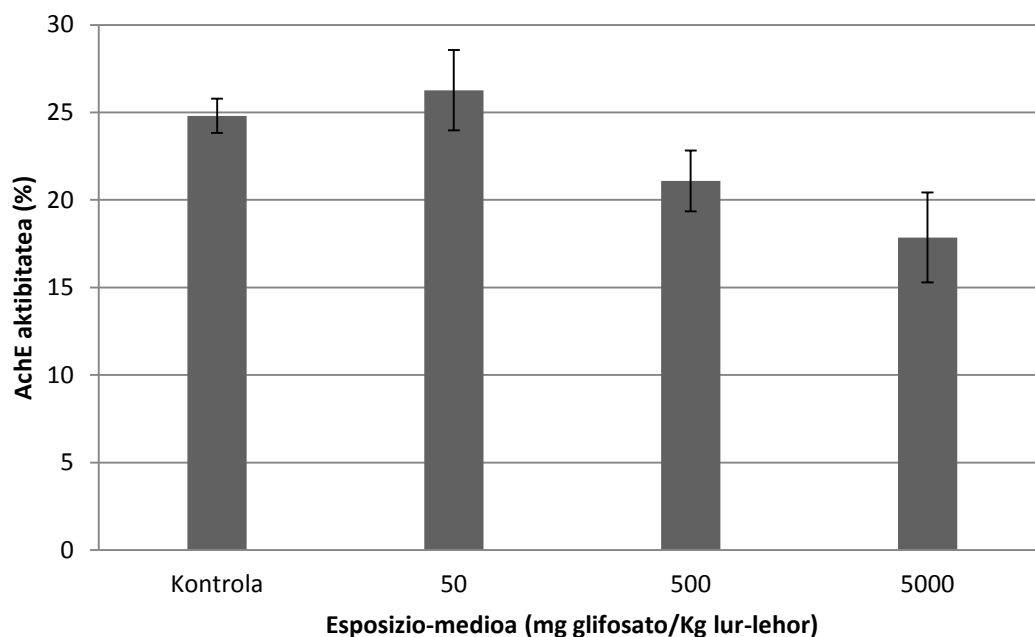
11. *Irdia* Zizareen gongoil zerebroidea (toluidina tindatzailea); kontrola (C), 50mg glifosato/Kg lur-lehor (L), 500mg glifosato/Kg lur-lehor (M) eta 5000mg glifosato/Kg lur-lehor (H).



12. *Irdia* Azetilkolinesterasa aktibitatea zizareen gongoil zerebroideaan; kontrola (C), 50mg glifosato/Kg lur-lehor (L), 500mg glifosato/Kg lur-lehor (M) eta 5000mg glifosato/Kg lur-lehor (H).

Azetilkolinesterasa aktibitatea histokimikoki detektatzeko tindaketa erabili ondoren, desberdintasunak ikusi ziren tratamenduen arteko gongoil zerebroideoen irudien artean (12. Irudia). Kontrol-ontzian egondako zizareetan azetilkolinesterasa aktibitatea handiagoa zela beha daiteke.

Gongoil zerebroideoko azetilkolinesterasa aktibitatearen inguruan egindako neurketei dagokienez, ikusi zen kontroleko eta kontzentrazio baxueneko zizareetan azetilkolinesterasa aktibitatea altuagoa zela, kontzentrazio ertaineko eta altuko zizareetan beherapen nabaria ikusi zelarik. Aktibitate baxuena glifosato kontzentrazio altueneko ontzian egondako zizareetan neurtu zen ($p > 0.05$) (13. Irudia).



13. Irudia Esposizio-medioaren arabera Azetilkolinesterasa entzimaren aktibitatea.

EZTABAIDA

Ikerketa honetan, gaur egun herbizida erabilienetakoa den glifosatoak zizareengan (*Eisenia fetida*) duen eragina ikertu nahi izan da. Horretarako parametro ezberdinak aztertu ziren: hilkortasuna, pisu galera, digestio-hodiko aldaketa morfologikoak eta azetilkolinesterasa entzimaren aktibitatea.

Hilkortasuna

Ikerlan honetan erabilitako baldintza esperimentalek, hau da, erabilitako glifosato kontzentrazioek zein esposizio-denborak ez zuten zizareen hilkortasunean eraginik izan. Gure ikerlanaren helburua biomarkatzaileen bidezko hilgarriak ez diren eraginak ikertzea zenez, bermatu nahi izan zen glifosato kontzentrazio altuenak zizareengan hilkortasunik ez sortzea. Horregatik, aukeratutako

kontzentrazioak beste ikerlan batzuetan aldez aurretik erabilitakoak baino baxuagoak izan ziren, izan ere bestelako lanetan 50000 mg Glifosato/Kg kontzentrazioan 7 egunez egondako zizareen %71 hil zela behatu zen (García-Torres et al., 2014), ikerlan berean kontzentrazio baxuagoetako lurretakoen biziraupena %100ekoa izan zelarik (50, 500, 5000 mg Glifosato/Kg). Beste alde batetik, aipagarria da guk erabilitako lurzorua (OECD lurzoru artifizia) materia organikotan aberatsa dela. Aldez aurretik aipatu den moduan glifosatoak materia organikoan atxikitzeko ahalmen handia dauka (Helander et al., 2011), beraz, bere mugikortasuna erabilitako baldintzetan mugatua da. Kontutan hartu behar da baita ere glifosatoaren degradazio-denbora luzeagoa dela ($T_{1/2} \approx 47$ egun) naturan (Schuette, 1998), esposizio-denbora luzatzeak eragin desberdinak izan ditzakeelarik zizareen biziraupenean nahiz eta erabilitako kontzentrazioak oso altuak ez izan.

Pisuaren aldaketa

Pisuaren aldaketak glifosatoaren eraginaren inguruko informazio gutxi eskaintzen digu, izan ere, kontrol zein glifosato pean mantendutako beste hiru ontzietako zizare-populazioetan antzeko pisu galera behatu zen esperimenduaren amaieran. Pisu galera orokor hau esperimenduan erabilitako lur artifizialek zizareengan sortutako estresaren ondorio izan daiteke; lur artifizia horretan zizareak 24 orduz aklimatatzen utzi ziren arren, baliteke aklimatatzeko denbora hau nahikoa ez izatea eta zizareak baldintza berrietara behar bezala aklimatatzeko denbora gehiago behar izatea. Aldez aurretik burututako esperimenduetan ere behatu da zizareak 14 egunez OECD lurzoruetan mantenduta pisu galerak izaten dituztela (%12-16 bitartean) (Irizar, 2013). Emaitza hauen arabera, beraz, badirudi OECD lurrak zizareengan eragin dezakeela; hala ere, lurzoru artifizia hau toxikotasun test estandar askotan da erabilia, emaitzak konparagarriak izatea erraztuz. Beraz, lurzoru hobearik topatu ezean, aukera merke eta eraginkorra da. Hala ere, aipatu beharra dago gure emaitzak bat datozela García-Torres *et al.* (2014) ikerlariak egindako esperimenduaren emaitzekin, zeinetan ez zen glifosatoaren presentziaren ondoriozko biomasaren murrizpen esangarririk neurtu 5000 mg Glifosato/Kg kontzentrazio azpitik. Beste ikerlan batzuetan, ordea, zizareen pisu galera glifosato kontzentrazio eta esposizio-denborarekin guztiz erlazionatuta dagoela behatu zen (Correia & Moreira, 2010); hala ere, bi ikerlanetan erabilitako lurrak desberdinak ziren eta azken honetan erabilitako lurzoruen pHa askoz baxuagoa izanik ($\text{pH } 5.5 < \text{pH } 6.8$), seguruenik glifosatoaren eskuragarritasunean eragina izan zuen honek zizareen pisu-galeran eraginez, nahiz eta kontzentrazioak baxuagoak izan (10, 100, 500, 1000 mg Glifosato/Kg).

Digestio-hodiko aldaketa morfologikoak

Digestio-hodiaren epitelioan zenbait aldaketa behatu ziren. Lehen behaketak eginda, aldaketa nabarmenenak, orokorrean, digestio-hodiaren epitelioko altueraren jaitsieran eta digestio-hodiaren

borobiltasun faltan behatu ziren. Egindako neurketek talde esperimental desberdinen artean desberdintasun esangarririk erakutsi ez bazuten ere, digestio-hodiko epitelioaren altueran tendentzia argia ikusten da, non glifosato pean mantendutako zizareek epitelio-altuera txikiagoa erakutsi zuten. Erantzun hau erlaxionatuta egon daiteke glifosatoak ziklo zelularraren erregulazioan sortzen dituen eraginen inguruan egin zen ikerketaren emaitzekin, zeinetan glifosatoak ziklo zelularraren disfuntzioa eragiten duela behatu zen (Marc et al., 2004). Glifosatoaren presentziak eragindako zelulen zatiketa etetearen ondorio izan daiteke epitelioaren berriztatzea modu egokian ez gertatzea, eta honela glifosatodun lurretan egondako zizareen digestio-hodiko epitelioaren altuera baxuagoa izatea eta ondoren borobiltasuna galtzea. Beste alde batetik, zenbait ikerlanek metal astunen eta herbiziden pean mantendutako zizareetan tiflosolearen tamainaren jaitsiera bat deskribatu dute (Amaral & dos Santos Rodrigues, 2005; Fischer & Molnár, 1992), baina gure ikerlanean ez da horrelako aldaketarik behatu, ezta esposizio-denbora laburrean metal pean egondako zizareetan ere (Asensio, 2009).

Azetilkinesterasa aktibitatearen inhibizioa

Glifosatoaren esposizioaren aurrean azetilkinesterasa entzimaren aktibitatearen murrizpena behatu zen. Lortutako emaitza hauek bat datoz azken urteetan pestiziden eragina aztertzeke egin diren ekotoxikologia esperimentuekin, non kutsaduraren aurrean azetilkinesterasa aktibitatea inhibitzen dela erakutsi duten (Caselli et al., 2006).

Gaur egungo produktu kimikoen erabileraren emendioarekin batera, asko ugaritu dira produktu kimiko hauek ekosistemetan izan dezaketen eragina ikertzeke ekotoxikologia ikerketak. Hala ere, pestiziden artean gehien azertu diren kutsatzaileak intsektizidak izan dira (Bunemann et al., 2006), herbiziden eragina bigarren maila batean utziz. Honen arrazoia, herbizidak landareen espezifikoak diren mekanismoetan eragiteke sortuak izan direla eta beraz, animalien eragin negatiborik sortu behar ez dutenaren ideia izan daiteke. Baina, uste baino eragin larriagoak izan ditzakete ekosistemetan geroz eta hedatuago dauden eta degradazio-denbora luzeagoa duten herbizida hauek. Gainera, herbizida hauek, dagoeneko lurzoruetan dauden bestelako kutsatzaile organiko eta ez-organikoekin zer nolako elkarrekintzak izan ditzaketen ikertzea garrantzitsua litzateke kalteak larriagoak izan aurretik.

Ikerketa berriak aurrera eramane ahal izateke beharrezkoa litzake ekotoxikologia testetan oso erabilia den OECD lur artifizialak zizareengan zer nolako eragin zuzena duen ikertzea lur hau beste kutsatzailearen baten eragina ikertzeke erabili aurretik. Lur "perfektua" topatzea oso zaila bada ere, mota honetako testetarako ahalik eta lurzoru egokiena aurkitzea onuragarria litzake etorkizuneko ikerketak aurrera eramateke. Bestalde, esposizio-denbora luzatzeak kutsatzaileek naturan izan dezaketen benetako eragina azertzea ahalbidera dezake, izan ere, kutsatzaile hauek denbora luzean

diraute ekosistema desberdinetan guztiz ezabatzen edo degradatzen diren artean. Beraz, egokia litzake kutsatzaileek naturan duten joera ahalik eta egokien errepikatzen saiatzea ekotoxikologia test hauetan.

Ikerketa honetan erabili diren biomarkatzaileak erabilgarriak izan daitezke etorkizuneko ekotoxikologia testetan, glifosato eta beste kutsatzaile desberdinen eragina metodo desberdinez aztertzea ahalbidetzen baitute. Gainera, azetilkolinesterasaren neurketa histokimikoa, erabiliak diren neurketa biokimikoekin uztartzeko aukera egon daiteke.

ESKERRONAK

Eskerrak eman nahi dizkiot lan hau egiteko aukera eman didan Urtzi Izagirreri, laborategi munduan barneratzeko aukera emateaz gain, bertan izan ditudan zalantzak modu lagungarrienean argitzeagatik. Baita Beñat Zaldibarri ere, lan esperimental eta lan idatzia modu egokian bideratzen, izan ditudan akatsak ulertzen eta zuzentzen laguntzeagatik. Nerea Garcíari, esperimentua aurrera eramateko behar izan ditudan zizareak eskuragarri uzteagatik eta behar izan ditudan argipenak emateagatik. Azkenik, eskerrak eman nahi nizkioke familiari, honaino iristeko behar izan dudana sostengua emateagatik.

BIBLIOGRAFIA

- Amaral A. & dos Santos Rodrigues A., 2005. Metal accumulation and apoptosis in the alimentary canal of *Lumbricus terrestris* as metal biomarker. *Biometals*, 18:199-206.
- Asensio V., 2009. Health assessment of polluted soils after *Eisenia fetida* ex situ bioassays based on conventional and in vitro cellular biomarkers and microarray technologies. Doktoradutza-Tesia, UPV/EHU. 337 orr.
- Bartlett M.D., Briones M.J.I., Neilson R., Schmidt O., Spurgeon D. & Creamer R.E., 2010. A critical review of current methods in earthworm ecology: from individuals to populations. *European Journal of Soil Biology*, 46(2):67-73.
- Battaglin W.A., Rice K.C., Focazio M.J., Salmons S. & Barry R.X., 2008. The occurrence of glyphosate, atrazine, and other pesticides in vernal pools and adjacent streams in Washington, D.C., Maryland, Iowa, and Wyoming, 2005–2006. *Environmental Monitoring and Assessment*, 155:281-307.
- Borggaard O.K. & Gimsing A.L., 2008. Fate of glyphosate in soil and the possibility of leaching to ground and surface waters: a review. *Pest Management Science*, 64:441-456.
- Bunemann E.K., Schwenke G.D. & van Zwieten L., 2006. Impact of agricultural inputs on soil organisms: a Review. *Australian Journal of Soil Research*, 44(4):379-406.
- Calisi A., Lionetto M.G. & Schettino T., 2011. Biomarker response in the earthworm *Lumbricus terrestris* exposed to chemical pollutants. Science of the Total Environment. *Elsevier*. 409:4456-4464.
- Caselli F., Gastaldi L., Gambi N. & Fabbri E., 2006. In vitro characterization of cholinesterases in the earthworm *Eisenia andrei*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, 143:416-421.
- Chacón-Díaz A.G. & Blanco-Rodríguez J.M., 1999. Manual práctico para la fabricación de abono orgánico utilizando lombrices. *Biomass Users Network (BUN-CA)*.
- Correia F.V. & Moreira J.C., 2010. Effects of Glyphosate and 2,4-D on Earthworms (*Eisenia foetida*) in Laboratory Tests. *Bulletin of Environmental Contamination Toxicology*, 85:264-268.
- Costa-Vilamajó J., Novillo-Almendros C. & Álvarez-Saborido A., 2011. Glifosato: 35 años de empleo y retos para el futuro. *Boletín de Sanidad Vegetal: Plagas*, 37:363-279.
- Cox C., 2004. Herbicide Factsheet: Glyphosate. *Journal of pesticide reform*, 24(4):10-15.
- DellaCioppa G., Bauer S.C., Klein B.K., Shah D.M., Fraley R.T. & Kishore G., 1986. Translocation of the precursor of 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase into chloroplasts of higher plants in vitro. *Proceedings of the National Academy of Science*, 83:6873-6877.
- Depledge, M.H., 1994. The rational basis for the use of biomarkers as ecotoxicological tools. Nondestructive Biomarkers in Vertebrates. 12.kapitulua, 271-295.orr.
- Duke S.O., 1990. Overview of herbicide mechanisms of action. *Environmental Health Perspectives*, 87:263-271.
- Duke S.O. & Powles S.B., 2008. Mini-review Glyphosate: A once-in-a-century herbicide. *Pest Management Science*, 64:319-325.
- Emmerling C. & Paulsch D., 2001. Improvement of earthworm (Lumbricidae) community and activity in mine soils from open-cast coal mining by the application of different organic waste materials. *Pedobiologia*, 45(5):396-407.
- Fischer E. & Molnár L., 1992. Environmental aspects of the chloragogenous tissue of earthworms. *Soil Biology and Biochemistry*, 24:1723-1727.
- Fox C.H., Johnson F.B., Whiting J. & Roller P.P., 1985. Formaldehyde Fixation. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 33(8):845-853.

- Franz J.E., Mao M.K. & Sikorski J.A., 1997. Glyphosate: A Unique Global Herbicide. *American Chemical Society*. 4.kapitulua, 65-97.orr.
- García-Torres T., Giuffré L., Romaniuk R., Ríos R.P. & Pagano E.A., 2014. *Bulletin of Environmental Contamination Toxicology*, 93:209-214.
- Giesy, J.P., Dobson S., & Solomon K., 2000. Ecotoxicological risk assessment for Roundup herbicide. *Reviews of Environmental Contaminant Toxicology*, 167:35-120.
- Helander M., Saloniemi I. & Saikkonen K., 2012. Glyphosate in northern ecosystems. *Trends in Plant Science*, 17(10)-569-574.
- Irizar A., 2013. Soil health assessment trough in vitro assays with primary cultures of coelomocytes of *Eisenia fetida*. Doktoradutza-Tesia. UPV/EHU. 256 orr.
- Jager T., Fleuren R.H.L.J., Hogendoorn E.A. & Korte G., 2003. Elucidating the Routes of Exposure for Organic Chemicals in the Earthworm, *Eisenia andrei* (Oligochaeta). *Environmental Sciences and Technologies*, 37(15):3399-3404.
- Jayasumana C., Gunatilake S. & Senanayake P., 2014. Glyphosate, hard water and nephrotoxic metals: Are they the culprits behind the epidemic of chronic kidney disease of unknown etiology in Sri Lanka? *International Journal Environmental Research and Public Health*, 11:2125-2147.
- Kalman R. & Lang E.J., 2008. Transmisión sináptica. Fisiología. *Elsevier*. 6.edizioa, 6.kapitulua, 82-104.orr.
- Kiely T., Donaldson D., Grube A. & Wu L., 2011. Pesticide industry sales and usage: 2006 and 2007 market estimates. EPA's Biological and Economic Analysis Division, Office of Pesticide Programs, Office of Chemical Safety and Pollution Prevention. U.S. EPA. Eskuragarri: http://epa.gov/opp00001/pestsales/07pestsales/market_estimates2007.pdf (2014ko abenduan sartua).
- Kolpin D.W., Thurman E.M., Lee E.A., Meyer M.T., Furlong E.T. & Glassmeyer S.T., 2006. Urban contributions of glyphosate and its degradate AMPA to streams in the United States. *Science of the Total Environment*, 354:191-197.
- Laerke P.E., 1995. Foliar Absorption of Some Glyphosate Formulation and their Efficacy on Plants. *Pesticide Science*, 44:107-116.
- Mamy L., Barriuso E. & Benoit G., 2005. Environmental fate of herbicides trifluralin, metazachlor, metamitron and sulcotrione compared with that of glyphosate, a substitute broad spectrum herbicide for different glyphosate-resistant crops. *Pest Management Science*, 61:905-916.
- Marc J., Mulner-Lorillon O. & Bellé R., 2004. Glyphosate-based pesticides affect cell cycle regulation. *Biology of the Cell*, 96:245-249.
- Mariño F., Ligerio A. & Cosin D.J.D., 1992. Heavy metals and earthworms on the border of a road next to Santiago. *Soil Biology and Biochemistry*, 24(12):1705-1709.
- Monaco T.J., Weller S.C. & Ashton F.M., 2002. Weed Science: Principles & Practices. *John Wiley & Sons*. 4.edizioa, 2.kapitulua, 188-397.orr.
- Morgan A.J., Stürzenbaun S.R., Winters C., Grime G.W., Aziz N.A.A. & Kille P., 2004. Differential metallothionein expression in earthworm (*Lumbricus rubellus*) tissues. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 57(1):11-19.
- Morowati M., 2000. Histochemical and histopathological study of the intestine of the earthworm (*Pheretima elongata*) exposed to a field dose of the herbicide glyphosate. *The Environmentalist*, 20:105-111.
- OECD. 1984. Guideline for testing of chemicals no. 207. Earthworm, Acute Toxicity Test. Eskuragarri: http://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-207-earthworm-acute-toxicity-tests_9789264070042-en (2014ko azaroan sartua).
- Rosales-Robles E. & Sánchez de la Cruz R., 2006. Clasificación y uso de los herbicidas por su modo de acción. *Sagarpa*.

- Rubin L., 1997. Effects of surfactants on the toxicity of Glyphosate, with specific reference to RODEO. Eskuragarri: <http://www.fs.fed.us/foresthealth/pesticide/pdfs/Surfactants.pdf> (2015eko ekainean sartua)
- Schönbrunn E., Eschenburg S., Shuttleworth W.A., Schloss J.V., Amrhein N., Evans J.N. & Kabsch W., 2001. Interaction of the herbicide glyphosate with its target enzyme 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase in atomic detail. *Proceedings of the National Academy of Science*, 98(4):1376-1380.
- Schuette J., 1998. Environmental fate of glyphosate, Glyphosate degradation pathway. Eskuragarri: <http://www.cdpr.ca.gov/docs/emon/pubs/envfate.htm> (2015eko ekainean sartua)
- Schuldt M., 2008. Iniciación de lombricultivos de *Eisenia fetida* (y *E. andrei*) (*Oligochaeta, Lumbricidae*) con siembras de baja densidad. *Boletín Ambiental Estructurplan*, 8(676):1-7.
- Scribner E.A., Battaglin W.A., Gilliom R.J. & Meyer M.T., 2007. Concentrations of glyphosate, its degradation product, aminomethylphosphonic acid, and glufosinate in ground- and surface-water, rainfall, and soil samples collected in the United States, 2001–2006. *Scientific Investigations Report 2007-5122*.
- Spencer L.T. & Bancroft J.D., 2013. Tissue processing and microarray. Theory and practice of histological techniques. *Elsevier*. 7.edizioa, 6.kapitulua, 105-138.orr.
- UNMS (University of Nottingham Medical School), 1998. Eskuragarri: <http://nottingham.ac.uk/~mpzilowe/protocols/cholase.html> (2015eko maiatzean sartua)
- USDA (United States Department of Agriculture), 2015. Soil Health Assessment, Soil Quality Indicator Sheets. Eskuragarri: <http://www.nrcs.usda.gov/wps/portal/nrcs/main/soils/health/assessment/> (2015eko martxoan sartua).
- Vereecken H., 2005. Mobility and leaching of glyphosate: a Review. *Pest Management Science*, 61:1139-1151.
- Yasmin S. & D'Souza D., 2007. Effect of pesticides on the reproductive output of *Eisenia fetida*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 79:529-532.
- Yasmin S. & D'Souza D., 2010. Effects of pesticides on the growth and reproduction of earthworm: a Review. *Applied and Environmental Soil Science*, 10:1-9.
- ZTH (Zientzia eta Teknologiaren hiztegi entziklopedikoa), 2013. Eskuragarri: <http://zthiztegiherria.elhuyar.org/artikuluak/Biomarkatzailea> (2015eko otsailean sartua)