

WPŁYW TEMPERATURY I BAKTERII GLEBOWYCH NA ODBUDOWĘ UKŁADU ODPORNOŚCIOWEGO I REPRODUKCJĘ DŹDŻOWNIC*

Ewa Olchawa, Barbara Czerny, Barbara Płytycz

Zakład Immunobiologii Ewolucyjnej, Instytut Zoologii, Uniwersytet Jagielloński, ul. Ingardena 6, 30-060 Kraków, e-mail: plyt@zuk.iz.uj.edu.pl

S t r e s z c z e n i e. *Dendrobaena veneta* (Annelida, Oligochaeta, Lumbricidae), drażnione eksperymentalnie prądem (5V) wyrzucają z przestrzeni celomatycznej około 95% celomocytów. Taka utrata celomocytów nie wpływa na przeżywalność zwierząt. W ciągu jednej doby po wyrzucie w celomie pojawia się około 50% wyjściowej liczby komórek. Ta liczba nie ulega zmianie u dżdżownic przeniesionych z temperatury pokojowej do temperatury 10°C, natomiast wraca do normy w ciągu 3-4 tygodni u okazów trzymanyh w 22°C. Koreluje to z niską i wysoką zawartością bakterii w płynie celomatycznym i próbkach gleby w 10 i 22°C po 6 tygodniach od wyrzutu komórek. Niska temperatura, lecz nie wyrzut celomocytów, wpływa na obniżenie liczby składanych kokonów.

S ł o w a k l u c z o w e: dżdżownice *Dendrobaena veneta*, temperatura, celomocyty, płyn celomatyczny, kokony

WSTĘP

Dżdżownice posiadają liczne mechanizmy zapewniające obronę przed zakażeniem. Oprócz barier anatomiczno-fizjologicznych, obronę przed drobnoustrojami umożliwia im system odpornościowy komórkowy (celomocyty zawieszony w płynie celomatycznym) oraz humoralny (lizozym, proteazy, układ profenolo-ksydazy). W warunkach naturalnych dżdżownice są narażone na utratę płynu celomatycznego wraz z celomocytami i substancjami rozpuszczonymi, gdyż zostaje on wyrzucony przez pory w grzbietowej stronie ciała u okazów podrażnionych przez czynniki chemiczne lub mechaniczne. W warunkach eksperymentalnych taki wyrzut celomocytów można sprowokować działaniem etanolu lub słabego prądu elektrycznego [5]. Wiadomo również, że pula celomocytów odbudowuje się u *Eisenia foetida* w ciągu 2 tygodni [3], natomiast u *Lumbricus terrestris* po 6 tygodniach [3].

*Praca była częściowo finansowana przez grant BW/9/IZ/2002.

Celem pracy było zbadanie wpływu temperatury oraz bakterii glebowych na przeżywalność i reprodukcję dżdżownic *Dendrobaena veneta*, a głównie na odbudowę puli celomocytów po ich wyrzucie przez eksperymentalne drażnienie prądem.

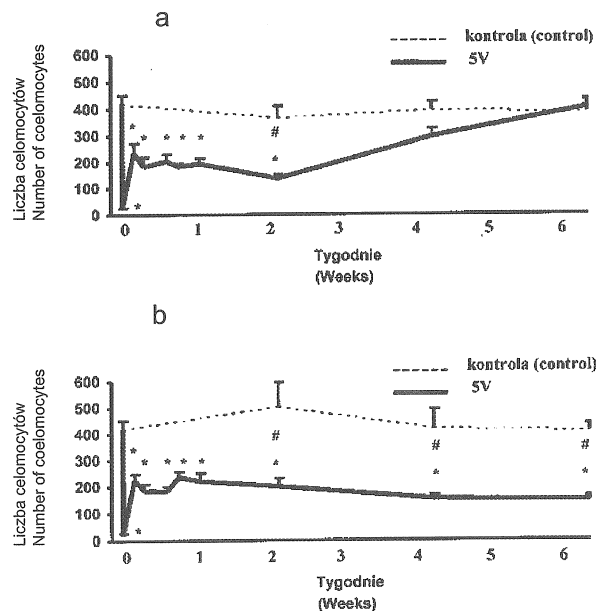
MATERIAŁ I METODY

Doświadczenie przeprowadzono na dorosłych osobnikach *D. veneta*, (pochodzących z Hodowli Dżdżownic Ekargo ze Słupska) przetrzymywanych w temperaturze 22 lub w 10°C (aklimacja do niskiej temperatury przez 2 tygodnie). U części zwierząt prowokowano wyrzut celomocytów działaniem przez 1 minutę prądu stałego (5V) wg Rocha [8]. Zwierzęta drażnione jak i nie drażnione prądem (kontrolne) umieszczono ponownie w glebie i przetrzymywano w temperaturze 22 lub 10°C przez 6 tygodni w okresie luty-marzec. Zwierzęta aklimowane do 10°C po wyrzucie celomocytów, umieszczono ponownie w 10°C. W przeciągu 6 tygodni sprawdzano przeżywalność osobników, liczbę wyprodukowanych kokonów, określono liczbę celomocytów (w hemocytometrze Bürkera) oraz określano poziom bakterii w glebie i płynie celomatycznym metodą MTT zaadoptowaną z prac Płytycz i Seljelida [7] oraz Olanczuk-Neyman i Jankowskiej [6]. Liczbę celomocytów pozostałych w jamie ciała po wyrzucie płynu celomatycznego oceniano poprzez rozcięcie znieczulonych uprzednio zwierząt, a następnie pobranie płynu z celomocytami pipetą Pasteurowską, po czym komórki liczono jak uprzednio. Do opracowania wyników użyto testu t-Studenta wykorzystując program komputerowy Exel 9.0

WYNIKI I DYSKUSJA

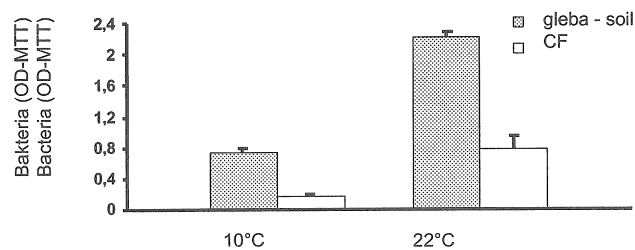
Działanie prądu elektrycznego spowodowało wyrzut $422,76 \pm 30,36$ celomocytów od okazu, co stanowiło około 95% puli tych komórek. W temperaturze 22°C już w ciągu pierwszej doby liczba celomocytów osiągnęła około 50% puli wyjściowej (prawdopodobnie na skutek ich uwolnienia z hipotetycznej puli zapasowej), a między 3 i 4 tygodniem wróciła do normy (prawdopodobnie na skutek proliferacji indukowanej stymulacją antygenową) (Rys. 1a). Pojawia się pytanie, czy proliferacji ulegają celomocyty w płynie celomatycznym, czy też celomocyty zlokalizowane w hipotetycznej puli zapasowej, która może - lecz nie musi - być tożsama z miejscem ich proliferacji.

U dżdżownic przetrzymywanych w ciągu całego doświadczenia w 22°C, jak i u okazów przeniesionych bezpośrednio po wyrzucie komórek do 10°C, pula



Rys. 1. Liczba celomocytów przed (czas 0) oraz po wyrzuceniu płynu celomatycznego działaniem 5V prądu na dżdżownice *Dendrobaena veneta* przetrzymywane w glebie 0-6 tygodni w temperaturze a) 22°C lub b) 10°C. Grupę kontrolną stanowiły dżdżownice nie drażnione prądem i przetrzymywane w tych samych warunkach. Gwiazdki wskazują istotną różnicę w liczbie celomocytów w stosunku do wartości wyjściowej. # - Różnica statystycznie istotna między grupą kontrolną a badaną ($p < 0,05$)

Fig. 1. The number of coelomocytes before (time 0) and after extrusion of coelomic fluid by 5V electric current from the earthworms *Dendrobaena veneta*, kept in the soil for 0-6 weeks at a) 22°C or b) 10°C. Control groups consisted of earthworms without electric shock and maintained at the same conditions. Asterisk indicate mean values significantly different from the initial number of coelomocytes. # Mean values statistically significantly different between the control and experimental groups ($p < 0,05$)



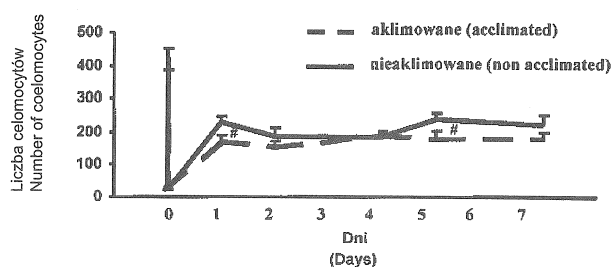
Rys. 2. Zawartość bakterii (mierzona testem MTT) w glebie oraz w płynie celomatycznym (CF) *D. veneta* w 6 tygodni po wyrzuceniu celomocytów z jamy ciała. OD - gęstość optyczna przy 570 nm

Fig. 2. Bacteria content in the soil and coelomic fluid (CF) of *D. veneta* at 6 weeks after extrusion of coelomocytes from coelomic cavity. OD - optical density at 570 nm

celomocytów osiągnęła w ciągu pierwszej doby 50% liczby wyjściowej, lecz - w przeciwieństwie do dość szybko powiększonej ich liczby w temperaturze pokojowej - w zimnie utrzymała się na takim poziomie przez cały okres trwania doświadczenia (6 tygodni) (Rys. 1b). Prawdopodobnie wynikało to z zahamowania proliferacji komórek w niskiej temperaturze i/lub ze zmniejszonej stymulacji antygenowej, gdyż 6 tygodni po wyrzucie komórek płyn celomatyczny dżdżownic trzymany w 10°C zawierał znacznie mniej bakterii, niż u okazów trzymany w 22°C, co korelowało z zawartością bakterii w glebie (Rys. 2).

W celomie zwierząt zaadoptowanych do 10°C w 24 godziny po wyrzucie pojawiło się tylko 30% komórek w stosunku do wartości wyjściowej, lecz w ciągu 4-7 dni liczba komórek osiągnęła 50% wyjściowej puli celomocytów, podobnie jak u okazów przeniesionych z ciepła do zimna dopiero po wyrzucie komórek (Rys. 3). Uwolnienie jeszcze mniejszej liczby celomocytów z puli zapasowej, niż u okazów z grupy poprzedniej, może być spowodowane zahamowaniem ich metabolizmu już podczas aklimacji do zimna.

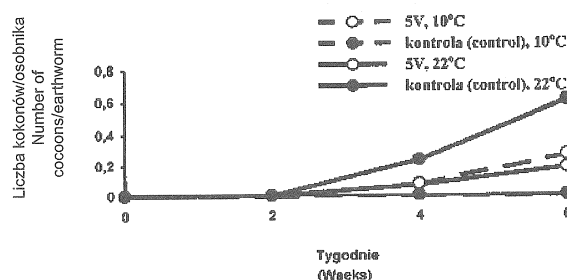
Utrata celomocytów prowadzi do nadmiernego rozwoju bakterii [1], co może prowadzić do intoksykacji organizmu i w konsekwencji jego śmierci. Dales i Kaláč [2] wykazali, że płyn celomatyczny pozbawiony celomocytów stwarza komfortowe warunki dla rozwoju bakterii, których liczba w ciągu 2 godzin wzrasta dwukrotnie. Wyrzut płynu celomatycznego jest naturalnym odruchem obronnym dżdżownic na uszkodzenia mechaniczne, podrażnienia chemiczne oraz atak drażniących. Istnienie puli zapasowej komórek odpornościowych chroni dżdżownicę przed rozwojem infekcji przez wiele dni po wyrzucie płynu celomatycznego, aż do odbudowy pełnej puli tych komórek.



Rys. 3. Liczba celomocytów wyrzucanych działaniem 5V prądu na dżdżownicę *Dendrobaena veneta* aklimowane i nieaklimowane do temperatury 10°C. # Różnica statystycznie istotna między grupą aklimowaną a nieaklimowaną ($p < 0,05$)

Fig. 3. The number of coelomocytes extruded by 5V electric current from earthworms *Dendrobaena veneta* acclimated and non-acclimated to 10°C. # Mean values statistically significantly different between acclimated and non-acclimated groups ($p < 0.05$)

W opisanych powyżej doświadczeniach, bez względu na temperaturę i wysoką lub niską zawartość bakterii glebowych, odnotowaliśmy 100% przeżywalność okazów. Okazało się także, że częściowa utrata komórek odpornościowych nie powodowała śmiertelności zwierząt ani też nie osłabiała ich reprodukcji. Produkcje kokonów *D. veneta* jest zależna od temperatury i jest niższa w 10 niż w 22°C (Rys. 4). Podobne rezultaty uzyskali Fayolle i in. [4] badając wpływ temperatury i pożywienia na rozmnażanie *D. veneta*. Stwierdzili oni, iż produkcja kokonów jest istotnie niższa w temperaturze 10°C niż w 20 i 25°C.



Rys. 4. Liczba składanych kokonów przez osobniki *D. veneta* pozbawione celomocytów działaniem 5V prądu i przez osobniki kontrolne, przetrzymywane w 10 lub 22°C

Fig. 4. The number of cocoons deposited by *D. veneta* depleted of coelomocytes with 5V electric current and respective control animals, kept at 10 or 22°C

WNIOSKI

1. Drażnienie prądem (5V) dżdżownic (*Dendrobaena veneta*) powoduje wyrzut około 95% celomocytów z przestrzeni celomatycznej. W ciągu pierwszej doby po wyrzucie pojawia się około 50% puli wyjściowej celomocytów.

2. W temperaturze 10°C tempo odbudowy celomocytów oraz reprodukcja *D. veneta* jest wolniejsze niż w 22°C.

PIŚMIENNICTWO

1. Çotuk A., Dales R.P.: Lysozyme activity in the coelomic fluid and coelomocytes of the earthworm *Eisenia foetida* Sav. in relation to bacterial infection. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 3, 469-474, 1984.
2. Dales R.P., Kalaç Y.: Phagocytic defence by the earthworm *Eisenia foetida* against certain pathogenic bacteria. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 3, 487-490, 1992.
3. Eyambe G.S., Goven A.J., Fitzpartick L.C., Venables B.J., Cooper E.L.: A non-invasive technique for sequential collection of earthworm (*Lumbricus terrestris*) leukocytes during subchronic immunotoxicity studies. *Laboratory Animals*, 25(1), 61-67, 1991.

4. **Fayolle L., Michaud H., Cluzeau D., Stawiecki J.:** Influence of temperature and food source on the life cycle of the earthworm *Dendrobaena veneta* (Oligochaeta). *Soil Biology and Biochemistry*, 3/4, 747-750, 1997.
5. **Kurek A., Homa J., Plytycz B.:** Earthworm coelomocytes: convenient model for basic and applied sciences In: A new model for analyzing antimicrobial peptides with biomedical applications (E.L. Copper, Ed.) IOS Press Nato Science Series. pp. 38-46, 2002.
6. **Olanczuk-Neyman K., Jankowska K.:** Bacteriological quality of the sand beach Sopot (Gdansk Bay, Southern Baltic). *Polish Journal of Environmental Studies*, 10, 451- 455, 2001.
7. **Plytycz B., Seljelid R.:** Bacterial clearance by the sea urchins *Strongylocentrotus droebachiensis*. *Developmental and Comparative Immunology*, 17, 283-289, 1993.
8. **Roch P.:** Protein analysis of earthworm coelomic fluid: I. Polymorphic system of natural hemolysin of *Eisenia foetida andrei*. *Developmental and Comparative Immunology*, 3, 599-608, 1979.

EFFECTS OF TEMPERATURE AND SOIL BACTERIA ON RESTORATION OF THE IMMUNE SYSTEM AND REPRODUCTION OF EARTHWORMS

Ewa Olchawa, Barbara Czerny, Barbara Plytycz

Department of Evolutionary Immunobiology, Institute of Zoology, Jagiellonian University, Ingardena str. 6, 30-060 Cracow, Poland; e-mail: plyt@zuk.iz.uj.edu.pl

S u m m a r y. *Dendrobaena veneta* (Annelida, Oligochaeta, Lumbricidae), irritated with electric current (5V) extrude from the coelomic cavity up to 95% of coelomocytes. Such a loss of coelomocytes does not affect the animal viability. During twenty-four hours after extrusion about 50% of the initial number of coelomocytes is restored. This number does not change in earthworms transferred from the room temperature to 10°C, while is restored to the control level during 3-4 weeks in animals kept at 22°C. This correlates with the low and high bacterial content in the coelomic fluid and soil samples at 10 and 22°C at 6 weeks after cell extrusion. The low temperature, but not coelomocytes loss, causes the decrease of the numbers of deposited cocoons.

K e y w o r d s: *Dendrobaena veneta*, temperature, coelomocytes, coelomic fluid, cocoons