

Projekt PAÖ-Ö 97 006

**Kupfertoleranz von Regenwurm-Arten aus
kupferbelasteten Weinbergsbrachen in Baden-
Württemberg**

Schlußbericht

**IFAB Institut für Angewandte Bodenbiologie GmbH
Sodenkamp 62, 22337 Hamburg**

**Bearbeiter: Dr. Eduard Belotti
Arbeitsstelle Stuttgart**

März 1999

Kurzfassung

Regenwürmer aus stark mit Kupfer kontaminierten Böden von Weinbergsbrachen in Baden-Württemberg wurden auf ihre Empfindlichkeit bzw. Toleranz gegenüber Kupfer getestet. Dabei diente als Maß für die Schädigung der Tiere unter Kupfereinfluß die Stabilität der Lysosomen-Membran in den Coelomozyten im Laborversuch, die sich gegenüber einer Vielzahl von Schadstoffen als empfindlich erwiesen hat. Es wurde ein Vergleich zwischen der weit verbreiteten Art *Aporrectodea rosea* (Savigny) und der seltenen, vermutlich eingeschleppten Art *Allolobophora thaleri* Zicsi durchgeführt, die auf stark kontaminierten Böden, die für *Aporrectodea*-Arten bereits toxisch sind, zum Teil in hohen Abundanzen vorkommt. Zudem wurde die Kupfertoleranz von Individuen beider Arten von unbelasteten und belasteten Flächen verglichen. In einem Laborversuch, bei dem Individuen beider Arten maximal 5 Monate in kontaminiertem bzw. nicht kontaminiertem Boden gehalten wurden, sollte geprüft werden, ob die Toleranz auf einer genetisch fixierten Adaptation oder einer physiologischen Anpassung beruht. Im zweiten Fall war ein Rückgang der Kupfertoleranz bei den in nicht kontaminiertem Boden lebenden Individuen zu erwarten.

Mit dem gewählten Ansatz waren keine Unterschiede in der Kupfertoleranz verschiedener Arten bzw. verschiedener Herkünfte derselben Arten nachzuweisen. Das starke Vorkommen von *Allolobophora thaleri* auf stark kontaminierten Flächen, auf denen die empfindlichen *Aporrectodea*-Arten bereits völlig fehlen, legt aber einen solchen Unterschied durchaus nahe. Es erscheint denkbar, diese Art auch in kupferkontaminierten Böden mit verarmten Regenwurm-Zönosen gezielt auszubringen, um eine – auf einigen Flächen bereits nachgewiesene - Störung der Nährstoffkreisläufe zu beheben. Zuvor ist allerdings noch zu klären, ob *Allolobophora thaleri* die verschwundenen Arten in ihren Funktionen ersetzen kann und welche Nebeneffekte das Aussetzen dieser Art in kontaminierten Böden hat.

Summary

Copper tolerance of two species of earthworm from abandoned vineyards in Baden-Württemberg was compared. Vineyard soils were highly contaminated with copper by long-term use of fungicides. Copper intoxication in earthworms was measured by a test of lysosomal membrane integrity which has been proven susceptible against a broad range of chemicals. Comparison was made between *Aporrectodea rosea* (Savigny), a species with widespread occurrence, and the rare species *Allolobophora thaleri* Zicsi which probably was

carried in rather recently and which seems to replace *Aporrectodea rosea* Savigny at highly contaminated sites. Besides, copper tolerance of individuals of both species from uncontaminated and contaminated sites was compared. In a laboratory experiment individuals of both species were kept in contaminated and uncontaminated soil, respectively, for five months, in order to test if copper tolerance is the result of genetic adaptation or physiological acclimation. In the latter case copper tolerance was expected to diminish with time in the individuals living in uncontaminated soil.

The chosen technique did not reveal a superior copper-tolerance of *Allolobophora thaleri* compared to *Aporrectodea rosea* or of individuals of both species from contaminated sites compared with individuals from uncontaminated sites. The presence of *Allolobophora thaleri* in high abundance on heavily contaminated sites where the susceptible *Aporrectodea* species are totally lacking, however, suggests a higher tolerance of this species. Its application in copper-contaminated soils with earthworm cenoses of reduced diversity appears conceivable in order to remedy a disturbance of nutrient cycles. Such disturbances have taken place on some copper-contaminated sites. Before that, it has to be tested if *Allolobophora thaleri* is able to replace the vanished species in their functions and which side effects after its application have to be expected.

Projekt PAÖ-Ö 97 006

**Kupfertoleranz von Regenwurm-Arten aus
kupferbelasteten Weinbergsbrachen in Baden-
Württemberg**

Schlußbericht

**IFAB Institut für Angewandte Bodenbiologie GmbH
Sodenkamp 62, 22337 Hamburg**

**Bearbeiter: Dr. Eduard Belotti
Arbeitsstelle Stuttgart**

März 1999

Kurzfassung

Regenwürmer aus stark mit Kupfer kontaminierten Böden von Weinbergsbrachen in Baden-Württemberg wurden auf ihre Empfindlichkeit bzw. Toleranz gegenüber Kupfer getestet. Dabei diente als Maß für die Schädigung der Tiere unter Kupfereinfluß die Stabilität der Lysosomen-Membran in den Coelomozyten im Laborversuch, die sich gegenüber einer Vielzahl von Schadstoffen als empfindlich erwiesen hat. Es wurde ein Vergleich zwischen der weit verbreiteten Art *Aporrectodea rosea* (Savigny) und der seltenen, vermutlich eingeschleppten Art *Allolobophora thaleri* Zicsi durchgeführt, die auf stark kontaminierten Böden, die für *Aporrectodea*-Arten bereits toxisch sind, zum Teil in hohen Abundanzen vorkommt. Zudem wurde die Kupfertoleranz von Individuen beider Arten von unbelasteten und belasteten Flächen verglichen. In einem Laborversuch, bei dem Individuen beider Arten maximal 5 Monate in kontaminiertem bzw. nicht kontaminiertem Boden gehalten wurden, sollte geprüft werden, ob die Toleranz auf einer genetisch fixierten Adaptation oder einer physiologischen Anpassung beruht. Im zweiten Fall war ein Rückgang der Kupfertoleranz bei den in nicht kontaminiertem Boden lebenden Individuen zu erwarten.

Mit dem gewählten Ansatz waren keine Unterschiede in der Kupfertoleranz verschiedener Arten bzw. verschiedener Herkünfte derselben Arten nachzuweisen. Das starke Vorkommen von *Allolobophora thaleri* auf stark kontaminierten Flächen, auf denen die empfindlichen *Aporrectodea*-Arten bereits völlig fehlen, legt aber einen solchen Unterschied durchaus nahe. Es erscheint denkbar, diese Art auch in kupferkontaminierten Böden mit verarmten Regenwurm-Zönosen gezielt auszubringen, um eine – auf einigen Flächen bereits nachgewiesene - Störung der Nährstoffkreisläufe zu beheben. Zuvor ist allerdings noch zu klären, ob *Allolobophora thaleri* die verschwundenen Arten in ihren Funktionen ersetzen kann und welche Nebeneffekte das Aussetzen dieser Art in kontaminierten Böden hat.

Summary

Copper tolerance of two species of earthworm from abandoned vineyards in Baden-Württemberg was compared. Vineyard soils were highly contaminated with copper by long-term use of fungicides. Copper intoxication in earthworms was measured by a test of lysosomal membrane integrity which has been proven susceptible against a broad range of chemicals. Comparison was made between *Aporrectodea rosea* (Savigny), a species with widespread occurrence, and the rare species *Allolobophora thaleri* Zicsi which probably was

carried in rather recently and which seems to replace *Aporrectodea rosea* Savigny at highly contaminated sites. Besides, copper tolerance of individuals of both species from uncontaminated and contaminated sites was compared. In a laboratory experiment individuals of both species were kept in contaminated and uncontaminated soil, respectively, for five months, in order to test if copper tolerance is the result of genetic adaptation or physiological acclimation. In the latter case copper tolerance was expected to diminish with time in the individuals living in uncontaminated soil.

The chosen technique did not reveal a superior copper-tolerance of *Allolobophora thaleri* compared to *Aporrectodea rosea* or of individuals of both species from contaminated sites compared with individuals from uncontaminated sites. The presence of *Allolobophora thaleri* in high abundance on heavily contaminated sites where the susceptible *Aporrectodea* species are totally lacking, however, suggests a higher tolerance of this species. Its application in copper-contaminated soils with earthworm cenoses of reduced diversity appears conceivable in order to remedy a disturbance of nutrient cycles. Such disturbances have taken place on some copper-contaminated sites. Before that, it has to be tested if *Allolobophora thaleri* is able to replace the vanished species in their functions and which side effects after its application have to be expected.

Inhalt

Einführung und Problemstellung	1
Wissenschaftlicher Kenntnisstand	2
Kupferempfindlichkeit und Kupfertoleranz von Regenwürmern	2
Genetische Adaptation an Schwermetallkontamination bei Invertebraten, insbesondere bei Regenwürmern	2
Stabilität der Lysosomenmembran als zellulärer Biomarker für die Schadstoffbelastung	3
Material und Methoden	5
Gewinnung der Coelomozyten	7
Durchführung des Neutralrot-Retention-Assay	8
Auswertung	9
Ergebnisse	10
Typisierung der Coelomozyten	10
Anzahl der gefundenen Coelomozyten	11
Membranstabilität	11
Diskussion	14
Praktische Verwendbarkeit der Ergebnisse	16
Literatur	17
Anhang: Testprotokolle	19

Einführung und Problemstellung

Infolge jahrzehntelanger Ausbringung von Fungiziden auf Kupferbasis sind die Böden in Weinbergen und Weinbergsbrachen stark mit Kupfer kontaminiert. Dabei werden Gehalte bis zum 100-fachen der Hintergrundgehalte erreicht. Als Folge davon gehen Arten der Gattungen *Aporrectodea* und *Allolobophora* stark zurück, wie Belotti (1997, 1998) in Freilandexperimenten auf 78 Flächen in Wein- und Hopfenbaugebieten in Baden-Württemberg nachweisen konnte.

Abweichend davon scheint *Allolobophora thaleri*, eine in Baden-Württemberg erstmals gefundene Art mit räumlich eng begrenztem Vorkommen im Einzugsgebiet der Rems, auf Flächen mit hohem Kupfergehalt in höheren Abundanzen vertreten zu sein als auf nicht kontaminierten Flächen. Die Art wurde vermutlich im Wurzelballen von Pflanzen eingeschleppt. Eine Hypothese zur Erklärung ihres Verbreitungsmusters ist, daß sie kupfertoleranter ist als die übrigen – konkurrenzüberlegenen - *Aporrectodea*- und *Allolobophora*-Arten und sich dort ausbreiten kann, wo diese infolge des Kupfereinflusses zurückgehen. Es ist aber auch denkbar, daß das Verbreitungsmuster der Art von mehrfacher Einschleppung und gebietsinterner Verschleppung herrührt.

Ziel des Forschungsvorhabens war es zu prüfen, ob

- *Aporrectodea rosea* und *Allolobophora thaleri* sich in ihrer Kupferempfindlichkeit unterscheiden
- Individuen dieser beiden Arten von verschiedenen stark mit Kupfer kontaminierten Flächen sich in ihrer Kupferempfindlichkeit unterscheiden
- eine evtl. gefundene erhöhte Kupfertoleranz genetisch bedingt ist oder auf physiologischer Anpassung der Individuen beruht.

Als Maß für die Kupfertoleranz wurde die Permeabilität der Lysosomen-Membranen in den Coelomocyten der beiden Arten herangezogen, die sich im Laborversuch bei *Aporrectodea rosea* als kupferempfindlich erwiesen hat (Harreus et al. 1997). Die Annahme dabei war, daß die Kupfertoleranz der Tiere umso größer ist, je geringer die Erhöhung der Membranpermeabilität durch die Kupfereinwirkung ausfällt. Zusätzlich wurde geprüft, ob die auf diese Weise ermittelte Kupfertoleranz bei Tieren, die in nicht kontaminiertem Boden gehalten werden, im Laufe der Zeit zurückgeht. Bei Vorliegen einer genetischen Adaptation war eine

stabile Kupfertoleranz zu erwarten. Beruht die Kupfertoleranz jedoch auf auf physiologischer Anpassung, dann war eine Abnahme bei längerer Haltung in nicht belastetem Boden zu erwarten.

Wissenschaftlicher Kenntnisstand

Kupferempfindlichkeit und Kupfertoleranz von Regenwürmern

Regenwürmer sind empfindlich gegenüber einem Überangebot des essentiellen Elements Kupfer. Dies trifft in besonderem Maß für endogäische Arten der Gattungen Aprorrectodea und Allolobophora zu, während Lumbricus-Arten erst bei sehr starker Belastung zurückgehen (Curry & Cotton 1980, Ma 1988, Belotti 1998). Dabei ist in erster Linie die Reproduktion der Regenwürmer betroffen (Ma 1988).

Genetische Adaptation an Schwermetallkontamination bei Invertebraten, insbesondere bei Regenwürmern

Erhöhte Toleranz von Organismen gegenüber toxischen Stoffen kann generell auf zwei unterschiedlichen Mechanismen beruhen (Posthuma & van Straalen 1993), und zwar

- auf physiologischer Anpassung (Akklimation) an den Stoff, die nur aufrechterhalten wird, solange der Organismus dem Stoff exponiert ist oder
- auf genetischer Adaptation, die auf der Selektion resistenterer Organismen beruht und vererbt wird.

Genetische Adaptation von Bodentieren an Cadmium wurde bei einzelnen Arten von Asseln und Springschwänzen nachgewiesen (Donker & Bogert 1991, Posthuma et al. 1992).

Individuen der Gehäuselandschneckenart *Helix aspersa* von stark bleikontaminierten Standorten zeigten im Laborversuch eine geringere Bleiaufnahme als Individuen von schwach oder nicht kontaminierten Standorten (Richmond & Beeby 1992). Da auch die Variation der Bleigehalte der Tiere vom belasteten Standort deutlich geringer war, schlossen die Autoren auf eine Selektion auf Genotypen mit stärkerer Fähigkeit zur Regulation der Bleiaufnahme am stark kontaminierten Standort.

Aquatische Oligochaeten der Gattung *Limnodrilus* entwickelten unter Cadmiumbelastung genetische Adaptation an dieses stark toxische Element (Klerks & Levinton 1989). Bei

Regenwürmern als terrestrischen Oligochaeten gibt es zwar Beispiele für erhöhte Toleranz gegenüber Cadmium unter dem Einfluß dieses Elements (Suzuki et al. 1980, Morgan et al. 1989, Reinecke et al. 1999). Bei den Arten, die hier untersucht wurden, handelt es sich um *Eisenia fetida*, *Lumbricus rubellus* und *Dendrodrilus rubidus*. Der Nachweis, daß dies auf genetischer Adaptation beruht, wurde allerdings in keinem Fall geführt (Posthuma & van Straalen 1993).

Bengtsson et al. (1992) untersuchten Regenwürmer der Art *Dendrobaena octaedra* von einem Standort in der Nähe einer Metallhütte, der eine Mischkontamination mit Schwermetallen aufwies, in der Zink und Kupfer dominierten. Bei dieser Population konnte gar keine erhöhte Toleranz der Tiere gegenüber der Belastung im Vergleich zu Tieren von nicht kontaminierten Standorten nachgewiesen werden. Es gab auch keine Hinweise auf die Entgiftung des Kupfers durch Festlegung in Cu-Thioneinen. Dagegen waren Cd-bindende Proteine in dieser Population nachweisbar, obwohl die Cd-Kontamination im Oberboden mit 3,5mg/kg noch moderat war.

Die häufig geäußerte Vermutung, daß die erhöhte Toleranz gegenüber toxischen Schwermetallen bei akuter Einwirkung zu Lasten anderer Lebensfunktionen geht, wurde in einer neuen Arbeit am Beispiel des Kompostwurms *Eisenia fetida* eindrucksvoll bestätigt: Eine Laborzucht dieser Art, die drei Jahre mit Cd-kontaminiertem Rinderkot gefüttert worden war, wies in Artificiel Soil mit hohen Cadmiumgehalten zwar ein signifikant stärkeres Wachstum und signifikant niedrigere Mortalität auf als Tiere einer Vergleichspopulation, hatte aber auch einen geringeren Reproduktionserfolg (Reinecke et al. 1999).

Stabilität der Lysosomenmembran als zellulärer Biomarker für die Schadstoffbelastung

Die Stabilität der Lysosomenmembranen ist ein unspezifischer und damit integrierender Biomarker. Sie wird durch eine Vielzahl von Schadstoffen beeinträchtigt (Huggett et al. 1992). Zur Messung der Membranstabilität ist der Neutralrot-Retention-Assay (NRRA) geeignet. Die lipophile Fremdstanz Neutralrot gelangt in intakten Zellen zunächst in die Lysosomen, wo sie protoniert wird (Lowe et al. 1992). Die Fähigkeit der Lysosomen, den Farbstoff im Innern zurückzuhalten, hängt von der Integrität der Lysosomenmembran ab. Sie wird durch die Retentionszeit T_{50} charakterisiert. Als Retentionszeit wird die Zeit bezeichnet, die vergeht, bis in 50 Prozent der Zellen das Cytosol durch den aus den Lysosomen austretenden Farbstoff angefärbt ist.

Als nicht-destruktive Methode zur Gewinnung von Zellen aus Regenwürmern für diesen Test wurde von Goven et al. (1994) die Extrusion von Coelomozyten vorgeschlagen. Bei mechanischer oder chemischer Reizung stoßen Regenwürmer aus ihren Rückenporen Zellen, die in der Coelomflüssigkeit schwimmen, die sog. Coelomozyten, aus (Peters & Walldorf 1986). Coelomozyten für Zelltests wurden bisher bei den Regenwurm-Arten *Lumbricus terrestris* L. (Eyambe et al. 1991, Goven et al. 1994), bei *Lumbrius castaneus* (Savigny) (Svendsen et al. 1996), *Eisenia fetida* (Savigny) (Salagovic et al. 1996) und *Aporrectodea rosea* (Savigny) (Harreus et al. 1997) gewonnen.

Der Neutralrot-Retention-Assay an Coelomozyten von Regenwürmern wurde mehrfach zum Nachweis von Belastungen durch Schadstoffe eingesetzt. Svendsen et al. (1996) ermittelten mit der Methode die Reichweite der Beeinträchtigung von Bodenorganismen durch ein Feuer in einer Plastik-Recycling-Anlage. Bei diesem Schadensfall verbrannten unter anderem PVC und PE. Das Feuer führte zu einer Freisetzung von Schwermetallen und eines in seiner Zusammensetzung nicht exakt bestimmbareren „Cocktails“ aus zahlreichen organischen Schadstoffen. Der Test wurde an Exemplaren von *Lumbricus castaneus* durchgeführt, die in verschiedener Entfernung vom Werk gefangen wurden. Die Retentionszeit, die am 300 m entfernten Kontroll-Standort 25 Minuten betrug, lag in 200 m Entfernung bei 10 Minuten und in Entfernungen von 60 m und weniger bei 1 Minute.

Harreus et al. (1997) untersuchten im Labor die Auswirkungen von Kupferchlorid in steigenden Konzentrationen auf die Neutralrot-Retention in Lysosomen bei *Aporrectodea rosea*. Dazu wurden die Tiere 10 Tage in humusarmen Sandböden mit pH 5,6 mit experimentell hergestellten Cu-Konzentrationen von 20, 40, 80, 160 und 320 mg/kg exponiert. Die Kontrolle bestand aus demselben Boden ohne Kupferzugabe. Er wies die Hintergrundkonzentration (3 mg/kg) auf. Während die Retentionszeit in der Kontrolle im Mittel über 50 Minuten lag, verkürzte sie sich bei 20 mg/kg auf ca. 20 Minuten. Bei 80 mg/kg lag sie bei etwa 10 Minuten. Die Tiere, die noch höheren Kupfergehalten exponiert worden waren, gaben kaum noch Coelomozyten ab, so daß der Test nicht durchgeführt werden konnte.

Material und Methoden

Zur Beantwortung der in der Einführung gestellten Fragen wurden adulte Individuen der Arten *Aporrectodea rosea* und *Allolobophora thaleri* aus Böden mit unterschiedlich starker Kupferkontamination per Handauslese gewonnen. Die zeitaufwendige Handauslese wurde gewählt, da sie für endogäische Arten besonders effektiv ist und da eine eventuelle Beeinträchtigung der Individuen durch Austreibung mit Formalin oder elektrischem Strom nicht hinnehmbar war. Vorgesehen war die Entnahme beider Arten von einer Fläche ohne Kupferkontamination (R29) und einer Fläche mit mäßiger Kupferkontamination (R8) sowie die Entnahme von *Allolobophora thaleri* auf zwei Flächen mit starker Kupferkontamination (R27 und R9, alle im Einzugsgebiet der Rems, siehe Tabelle 1). Da im Gegensatz zu einer früheren Beprobung (Belotti 1997) auf der mäßig kontaminierten Fläche R8 *Aporrectodea rosea* nicht auffindbar war, wurde als Quelle für *Aporrectodea rosea* unter mäßigem Kupferstreß eine Fläche im Einzugsgebiet der Enz bei Markgröningen (M20, siehe Tabelle 1) herangezogen. Ihre Kontamination mit Kupfer war allerdings deutlich geringer als die der Fläche R8.

Tabelle 1: Gehalte an mobilem Kupfer und Regenwurm-Arten der Untersuchungsflächen (Aus Belotti 1997)

Flächenbezeichnung	NH ₄ NO ₃ -extrahierbares Kupfer (µg/kg)	Entnommene Regenwurmarten
R29	30	<i>Aporrectodea rosea</i> <i>Allolobophora thaleri</i>
M20	230	<i>Aporrectodea rosea</i>
R8	797	<i>Allolobophora thaleri</i>
R27	1765	<i>Allolobophora thaleri</i>
R9	2086	<i>Allolobophora thaleri</i>

Die Labortests an den Regenwurm-Coelomozyten wurden in der Abteilung Zellbiologie des Zoologischen Instituts der Universität Tübingen durchgeführt.

Jeweils 6 Tiere von allen Flächen wurden wenige Tage nach der Entnahme auf Kupfertoleranz getestet. Von *Aporrectodea rosea* aus der Fläche M20 sowie von *Allolobophora thaleri* aus den Flächen R8 und R9 wurden vier weitere Kollektive aus je 6 Tieren ausgewählt. Die Kollektive wurden hinsichtlich der Größe der Tiere möglichst gleichartig gestaltet. Jeweils 2 Teilkollektive wurden in Plastikboxen mit Boden vom Herkunftsstandort (Behandlungsart K = kontaminiert) und 2 in Plastikboxen mit unkontaminiertem, in Bodenart, pH und Humusgehalt aber gleichartigem Boden (Behandlungsart U = unkontaminiert)

eingesetzt. Die Boxen wurden bei konstanter Temperatur von 15° C aufbewahrt. Diese Ansätze dienten der Untersuchung der Frage, ob sich eine eventuelle Kupfertoleranz bei Haltung in nicht kontaminiertem Boden im Lauf der Zeit verliert. Dazu wurde nach 2,5 bzw. 5 Monaten je ein Kollektiv jeder Behandlungsart dem Neutralrot-Retentions-Assay unterworfen.

Tabelle 2 gibt die Bodeneigenschaften der Böden der Untersuchungsflächen und der unkontaminierten Vergleichsböden wieder. Als Vergleichsboden für R8 und R9 diente R29, als Vergleichsboden für M20 diente M17.

Tabelle 2: Bodeneigenschaften der Untersuchungsflächen (Aus Belotti 1997)

Flächenbezeichnung	Bodenart	pH (CaCl ₂)	Humusgehalt (%)	NH ₄ NO ₃ -extrahierbares Kupfer (µg/kg)
R29	IT	6,3	4,3	30
R8	sT	7,2	2,5	797
R27	sT	7,3	5,2	1765
R9	sT	7,2	2,3	2086
M17	IT	7,0	4,0	100
M20	tL	7,2	4,2	230

Tabelle 3 gibt einen Überblick darüber, in welchen Varianten der NR-Retentions-Assay durchgeführt wurde.

Tabelle 3: Zusammenstellung der Varianten, an denen der NR-Retention-Assay durchgeführt wurde (mit x gekennzeichnet).

Regenwurm-Art	Herkunft	1. Termin: 22.-30.06. 1998	2. Termin: 8.-15.09.1998		3. Termin: 23.-27.11.1998	
			Behandlungsart		Behandlungsart	
			K	U	K	U
Aporrectodea rosea	R29	x				
	M20	x	x	x	x	x
Allolobophora thaleri	R29	x				
	R8	x	x	x	x	x
	R9	x	x	x	x	x

Die Membranstabilität wurde jeweils nach einer Kurzzeitexposition gegenüber Kupfer mit dem beschriebenen Ansatz getestet. Für die Kurzzeitexposition wurde eine Kupferlösung von 2 mg/l (als Acetat) in destilliertem Wasser hergestellt. Damit wurde Filterpapier bis zur Sättigung getränkt. Kleine Petrischalen (35 mm Durchmesser) wurden damit ausgekleidet, jeweils 1 Individuum hineingelegt und mit einem Deckel verschlossen, der ebenfalls vollständig mit in Cu-Lösung getränktem Filterpapier ausgelegt war. Auf diese Weise wurden die Tiere 1 Stunde bei 15 °C exponiert.

Gewinnung der Coelomozyten

Bei *Aporrectodea rosea* wurde die von Harreus et al. (1997) wiedergegebene Methodenvorschrift angewandt. Sie sieht folgendes vor:

Die Regenwürmer werden 3 Minuten mit 2 ml Extrusionslösung inkubiert. Die Extrusionslösung wird folgendermaßen hergestellt. 250 mg EDTA und 1 g Guaiacol-glycerinäther werden in 95 ml Kochsalzlösung und 5 ml Äthanol (reinst) unter intensivem Rühren auf dem Magnetrührer gelöst. Der pH-Wert wird mit NaOH auf 7,3 eingestellt. Die Salzlösung wird durch Lösen von 0,85 g NaCl in 100 ml destilliertem Wasser hergestellt. Der Alkohol in der Extrusionslösung bewirkt eine Reizung der Regenwürmer und veranlaßt sie, Schleim auszustoßen, der Coelomozyten enthält. Guaiacol-glycerinäther ist ein Schleimlöser, der auch in der Medizin verwendet wird. Er bewirkt, daß die Coelomozyten einzeln in der Lösung schwimmen. Nach 3 Minuten werden die Tiere herausgenommen und mit Kochsalzlösung abgespült.

Allolobophora thaleri konnte durch die beschriebene Prozedur nicht zum Ausstoßen von Coelomozyten veranlaßt werden. Aus diesem Grund wurden die Tiere mit Hilfe einer Präparationsschere und einer Pinzette in 200 µl Extrusionslösung seziiert. Dabei wurde möglichst nur die Leibeshöhle geöffnet, um Coelomflüssigkeit austreten zu lassen. Um Verunreinigungen der Extrusionslösung zu vermeiden, wurde versucht, den Darm unverletzt zu lassen. Das geringe Volumen wurde gewählt, um die Coelomozyten nicht zu stark zu verdünnen, da ihre Zahl sehr gering war.

Durchführung des Neutralrot-Retention-Assay

Der nach dem oben genannten Verfahren gewonnenen Zellsuspension wurden 10 ml (bei *A. thaleri* 1 ml) Regenwurm-Salzlösung zugegeben. Sie bestand aus NaCl (71,5 mM), KCl (4,8 mM), CaCl₂ (3,8 mM), MgSO₄* 7H₂O (1,1 mM), KH₂PO₄ (0,4 mM), Na₂HPO₄* 7H₂O (0,3 mM) und NaHCO₃ (4,2 mM) in destilliertem Wasser. Der pH-Wert wurde auf 7,6 eingestellt. 20 µl (bei *A. thaleri* 120 µl) der Suspension wurden auf einen Objektträger gegeben. Dort wurden sie 3 Minuten unberührt gelassen. In dieser Zeit heften sich nach Harreus et al. (1997) die Coelomzyten mit Pseudopodien an der Glasoberfläche an. Danach wurde der Tropfen abgesaugt und die Zellen dreimal mit 40 µl Regenwurm-Salzlösung gespült. Schließlich wurden 17 µl Regenwurm-Salzlösung und 20 µl Neutralrot-Arbeitslösung zugegeben und durch Pumpen mit der Eppendorf-Pipette durchmischt.

Die Neutralrot-Arbeitslösung besteht aus 10 µl einer frisch zubereiteten Neutralrot-Stammlösung und 2,5 ml Ringer-Lösung. Die Neutralrot (NR)-Stammlösung wird durch Lösung von 20 mg NR in 1 ml Dimethyl-Sulfoxid (DMSO) gewonnen. Die Ringer-Lösung besteht aus 6,0 g NaCl, 0,12 g KCl, 0,2 g CaCl₂ und 0,2 g NaHCO₃ in 1 l destilliertem Wasser.

Die Tropfen wurden mit einem Deckglas bedeckt und wiederholt durchgemustert. Die erste Durchmusterung erfolgte so schnell wie möglich nach Zugabe der NR-Arbeitslösung. Bei jedem Durchgang wurde die Gesamtzahl der Coelomozyten und die Zahl der Coelomozyten, deren Zellplasma durch Austritt des NR aus den Lysosomen verfärbt war, festgehalten.

Als Zeitpunkt 0 wurde die Zeit bei der Zugabe der NR-Arbeitslösung festgehalten. Das Durchmusteren erfolgte bei 400-facher Vergrößerung (Okular: 10-fach, Objektiv: 40-fach). Die Präparate wurden mit Nagellack versiegelt, um ein Austrocknen zu vermeiden. Pro Präparat wurden mindestens 6 Musterungen durchgeführt. Da vor allem bei *A. thaleri* zum Teil nur sehr wenige Coelomzyten gefunden wurden, mußten einzelne Musterungen, zum Teil auch einzelne Präparate verworfen werden. Die Gesamtzeit vom Zeitpunkt 0 bis zum Abbruch des Tests betrug mindestens 96 Minuten. Bei der Erhebung des Ausgangszustands (1. Termin) wurde dieser Zeitraum bei einigen Ansätzen auf über 300 Minuten ausgedehnt. Dies geschah deshalb, weil sich meist kein zeitlicher Trend in der Zahl der verfärbten Zellen abzuzeichnen schien. Die Langzeitversuche dienten der Kontrolle, ob es zu einem späteren Zeitpunkt zu einer Zunahme der verfärbten Zellen kommt. Die Zahl der Musterungen pro Präparat betrug in der Regel 6 bis 7, bei den längeren Tests 8 bis 9.

Aufgrund der generell geringen Zellzahl wurden die Präparate nicht, wie bei Harreus et al. (1997), entlang von zwei sich kreuzenden Linien durchgemustert, sondern im Zickzack möglichst komplett abgefahren. Um Überlappungen und damit Doppelzählungen zu vermeiden, mußten dabei allerdings relativ große Abstände eingehalten werden. Da Präparation und Musterungen möglichst schnell vonstatten gehen mußten, war es nicht möglich, bei den wiederholten Durchmusterungen exakt dieselben „Routen“ abzufahren. Deshalb schwanken die Zahlen der jeweils gefundenen Zellen von Musterung zu Musterung erheblich (s. Anhang).

Auswertung


Harreus et al. (1997) führten den NR-Retentions-Test solange durch, bis 70 % der Coelomozyten im Plasma verfärbt waren. Danach wurde für jedes Individuum die Regression des Anteils der verfärbten Zellen gegen die Zeit errechnet. Die Retentionszeit wurde aus der Regressionsgleichung abgeleitet.

Im vorliegenden Projekt wurden nur Zählungen, bei denen insgesamt mindestens 15 Coelomozyten gefunden wurden, berücksichtigt. Die Auswertung erfolgte für jedes Präparat getrennt. Präparate, bei der die Mehrzahl der Zählungen weniger als 15 Coelomozyten aufwies, wurden ausgeschlossen. Wenn bereits bei der ersten Zählung weniger als 15 Coelomozyten gefunden wurden, wurde das Präparat verworfen. An die Datensätze wurden verschiedene Modelle (linear, logarithmisch, Polynome 2. und 3. Ordnung) angepaßt. Das Modell mit dem höchsten Bestimmtheitsmaß r^2 wurde ausgewählt. Die Signifikanz des Korrelationskoeffizienten r wurde anhand von bei Sachs (1988) tabellierten Werten geprüft (Tabelle A10, Seite 255). Die Zahl der Freiheitsgrade war jeweils die um 2 verminderte Zahl der Musterungen.

Ergebnisse

Typisierung der Coelomozyten

Bei beiden Arten wurden Coelomozyten, die der Beschreibung und der Fotografie bei Harreus et al. (1997) entsprechen, gefunden. Sie werden hier als Typ A bezeichnet (Abbildung 1 a und b). Ihr Durchmesser betrug bei beiden Arten 11-17 μ . Daneben trat bei *Aporrectodea rosea* noch ein zweiter Typ auf (Typ B, Abbildung 2), der 35 bis 105 μ Durchmesser hatte.




10 μ

Abb. 1: Coelomozyt Typ A von

a) *Aporrectodea rosea*

b) *Allolobophora thaleri*



10 μ

Abb. 2: Coelomozyt Typ B von *Aporrectodea rosea*

Anzahl der gefundenen Coelomozyten

Tabelle 4 gibt die mittlere Anzahl der gefundenen Coelomonzyten pro Standort an. Von jedem Tier wurde ein Präparat angefertigt. Gemittelt wurde über die Zahl der auswertbaren Präparate (n). In den Fällen ohne Angabe für n gilt n = 6.

Tabelle 4: Mittlere Anzahl der gefundenen Coelomozyten des Typs A (oben: Mittelwert, unten: Standardabweichung)

Regenwurm- Art	Herkunft	1. Termin: 22.-30.06. 1998	2. Termin: 8.-15.09.1998		3. Termin: 23.-27.11.1998	
			Behandlungsart		Behandlungsart	
			K	U	K	U
Aporrectodea rosea	R29	35,7 14,0				
	M20	43,0 19,9	55,6 40,5 n = 5	45,0 14,8 n = 5	60,3 30,0 n = 4	42,3 13,7
Allolobophora thaleri	R29	53,7 14,6 (n = 3)				
	R8	34,6 2,7 n = 5	28,3 12,6 n = 5	28,2 8,8	62,0 10,6 n = 5	64,8 10,4 n = 4
	R9	33,4 15,4 n = 5	105,3 59,0	142,7 51,3	64,8 14,3	40,2 10,1

Membranstabilität

Die Ergebnisse zeichnen sich durch eine hohes Maß an Inkonsistenz aus. Nur bei 6 der 89 getesteten Tiere beider Arten, bei der die Zahl der Coelomozyten eine Auswertung erlaubte, war ein linearer zeitlicher Trend der Zellverfärbung nachweisbar, d.h. mit höchstens 5 % Irrtumswahrscheinlichkeit von 0 verschieden. Der Trend war in allen Fällen positiv. Die genannten 6 Fälle verteilen sich über alle Termine und Behandlungsarten: 1 beim ersten Untersuchungstermin, 4 beim 2. Untersuchungstermin und 1 beim 3. Untersuchungstermin. In den übrigen Fällen wurden nicht signifikant von 0 verschiedene schwach positive, in wenigen Einzelfällen schwach negative Regressionen gefunden. In 2 Fällen ergab eine Polynom 2. Grades die beste Anpassung an die Datensätze. In diesen Fällen hat möglicherweise bereits Zerfall des Farbstoffs im Cytosol stattgefunden.

In den Fällen mit signifikant positivem Trend wurde die Zeit bis zur Verfärbung von 50 % der Zellen (T_{50}) anhand der Regressionsgleichung bestimmt (Tabelle 5).

Tabelle 5: Regressionsgleichungen, Retentionszeiten und Korrelationskoeffizienten für die Tests mit signifikantem linearen zeitlichen Trend der Zellverfärbung

Regenwurm-Art	Fläche	Termin	Behandlungsart	Regressionsgleichung	Retentionszeit T_{50} (Minuten)	Korrelationskoeffizient r	Signifikanzniveau α
Aporrectodea rosea	R29	1	-	$y = 0,1909 x + 13,881$	189,2	0,8019	0,05
	M20	3	U	$y = 0,0753 x + 3,332$	619,8	0,81148	0,05
Allolobophora thaleri	R8	2	K	$y = 0,0948 x + 19,494$	321,8	0,827285	0,05
	R8	2	U	$y = 0,1515 x + 1,4315$	320,6	0,90824	0,05
	R9	2	K	$y = 0,0619 x + 14,646$	571,1	0,7283	0,05
	R9	2	U	$y = 0,1768 x + 26,272$	134,2	0,817863	0,05

Auch bei den Tests, bei denen kein zeitlicher Trend nachweisbar war, waren teilweise hohe Anteile der Zellen verfärbt (Tabelle 6). Diese Situation bestand dort bereits bei der ersten Durchmusterung nach 1 bis 5 Minuten. Es kann nicht entschieden werden, ob bereits in den ersten Minuten ein sehr rascher Austritt des Farbstoffs aus den Lysosomen stattfand oder ob eine „Störfärbung“ im Zellplasma von Anfang an bestand.

Im folgenden werden die Ergebnisse auf ihre Aussagekraft hinsichtlich der in der Einführung genannten Fragen überprüft. Als erstes war zu prüfen, ob die Retentionszeit T_{50} zwischen den Arten *Aporrectodea rosea* und *Allolobophora thaleri* im Ausgangszustand (1. Termin) unterschiedlich ist. An diesem Termin weist nur 1 Exemplar der Art *A. rosea* von der Fläche R 29 eine signifikanten linearen Trend in der Verfärbung der Zellen auf. Die errechnete T_{50} beträgt 189,2 Minuten. (Beim Vergleich der Retentionszeiten ist zu beachten, daß sie sowohl von der Steigung der Regressionsgerade als auch vom y-Achsen-Abschnitt abhängen.) Alle übrigen Tiere beider Arten weisen gewissermaßen „absolut stabile“ Membranen auf.

Tabelle 6: Über den Beobachtungszeitraum gemittelter Anteil verfärbter Zellen bei Tieren ohne signifikanten Trend

Regenwurm-Art	Herkunft	Mittlerer Anteil verfärbter Zellen (%)				
		1. Termin: 22.-30.06. 1998	2. Termin: 8.-15.09.1998		3. Termin: 23.-27.11.1998	
			Behandlungsart		Behandlungsart	
			K	U	K	U
Aporrectodea rosea	R29	11,4-32,5				
	M20	13,2-40,8	2,2-29,2	4,7-20,0	7,0-15,0	4,2-10,4
Allolobophora thaleri	R29	8,7-14,9				
	R8	6,9-37,2	8,0-19,4	9,3-35,1	2,1-13,5	4,3-11,7
	R27	25,7-38,8				
	R9	8,1-37,4	7,3-21,4	8,2-42,7	1,6-5,6	4,5-16,4

Die zweite Frage war die nach Unterschieden in der Membranstabilität unter Kupferbelastung bei Exemplaren derselben Art, die aus unterschiedlich stark mit Kupfer kontaminierten Böden stammen. Hier ist der Vergleich zwischen *Aporrectodea rosea* von R29 und M20 sowie zwischen *Allolobophora thaleri* von R29, R8, R 27 und R9 vom 1. Termin und der Behandlungsart K der weiteren Termine anzustellen. Auch hier ergeben sich keine Unterschiede zwischen den Varianten. Die überwiegende Zahl der Tiere zeigt keinen signifikanten zeitlichen Trend, mit Ausnahme von 2 Exemplaren von *Allolobophora thaleri*, wovon je 1 Exemplar von der mäßig kontaminierten Fläche R8 und der stark kontaminierten Fläche R9 stammte. Betrachtet man die Spanne der Anteile verfärbter Zellen in den Tests ohne signifikanten zeitlichen Trend (Tabelle 6), so sind auch hier kaum Unterschiede in den Varianten zu verzeichnen. Nur bei *A. thaleri* von der stark kontaminierten Fläche R27 scheint das Spektrum in den Bereich höherer Werte verschoben zu sein. Bei dieser Fläche waren allerdings nur die Präparate von drei Tieren auswertbar.

Die dritte Frage war, ob die Membranstabilität von Tieren aus kontaminierten Böden nach längerer Haltung in nicht kontaminiertem Boden abnimmt. Hierzu sind die Behandlungsarten K (Kontaminiert) und U (Unkontaminiert) zu vergleichen. Aufgrund der weitgehenden Gleichförmigkeit der Befunde in allen Varianten ist diese Frage anhand des hier erhobenen Materials nicht zu beantworten.

In Tabelle 6 zeigt sich ein Trend zu einer generellen Abnahme der Anteile verfärbter Zellen beim 3. Termin. Dies betrifft alle Arten, Herkünfte und Behandlungsarten gleichermaßen. Eine Erklärung für diesen Trend kann nicht gegeben werden.

Diskussion

Die Retentionszeiten waren in allen Ansätzen sehr viel höher als die von anderen Autoren ermittelten. Im Laborversuch von Harreus et al. (1997) wies *Aporrectodea rosea* in der Kontrolle mittlere Retentionszeiten bei 50 Minuten auf, sie gingen mit Zunahme der Kupferexposition bis 80 mg/kg zurück (auf 10 Minuten). Bei Tieren mit noch stärkerer Kupferexposition waren Coelomozyten in ausreichender Zahl nicht zu gewinnen. *Lumbricus castaneus* aus Feilandböden hatte Retentionszeiten von 25,3 Minuten in der Kontrolle bzw. von 1 Minute bei starker Schadstoffbelastung (Svendsen et al. 1996).

Im Gegensatz dazu war im vorliegenden Versuch nur eine sehr langsame Verfärbung des Cytosols zu beobachten. Ein Anteil von 50 % Zellen mit angefärbtem Cytosol wurde nur in Einzelfällen erreicht (s. Anhang). Die errechneten Retentionszeiten lagen zwischen 134 und 620 Minuten. In den übrigen Fällen waren sie noch sehr viel höher. Hier war die Austrittsrate des Farbstoffs praktisch 0, die Retentionszeit damit praktisch unendlich groß. Die zum Teil sehr hohen Ausgangswerte (y -Achsen-Abschnitt) sprechen allerdings dafür, daß dies ein Artefakt ist.

Die Zahl der Coelomozyten war generell gering. Harreus et al. (1997) fanden, daß bei der höchsten Kupferbelastung kaum noch Coelomozyten gewinnbar waren. Daß die geringe Ausbeute an Coelomozyten auch in diesem Fall auf die Belastung der Tiere zurückgeht, ist deswegen unwahrscheinlich, weil sie auch bei den Tieren von den Kontrollflächen auftrat.

Aufgrund der von Musterung zu Musterung schwankenden Zahl der gefundenen Zellen sind die ermittelten Prozentanteile unterschiedlich gut gesichert. Diese Unschärfe ändert allerdings nichts an dem generellen Befund, daß die meisten Zellen auch nach Stunden unverfärbt blieben.

Nach Ma (1988) führt Kupferexposition zu einer verringerten Reproduktion der Regenwurm-Arten. Vermutlich ist die Extinktion von Arten aus Böden, deren Kupfergehalt durch jahrzehntelange Cu-Fungizid-Applikation ansteigt, durch das Absinken der Reproduktionsrate

unter die Schwelle, die für die Erhaltung der Population notwendig ist, bedingt. Das Scheitern des Nachweises erhöhter Kupfertoleranz von *Allolobophora thaleri* durch den NRRA könnte darin begründet liegen, daß dieser Biomarker stärker mit akuten Belastungen und erhöhter Mortalität verknüpft ist als mit chronischen Belastungen und der Reproduktion.

Schlußfolgerungen für zukünftige Anwendungen des NR-Retentions-Assay:

1. Die Zahl der Coelomozyten und ihre Gewinnbarkeit ist bei den Regenwurm-Arten unterschiedlich. Bei der Art *Allolobophora thaleri* ist beides geringer als bei den von anderen Autoren untersuchten Arten *Lumbricus terrestris*, *L. castaneus*, *Eisenia fetida* und *Aporrectodea rosea*. Die Extrusionsmethode ist bei *Allolobophora thaleri* nicht anwendbar.
2. Als alternatives Maß für die Membranstabilität außer der Retentionszeit kommt die Steigung der Regressionsgerade der Zahl der verfärbten Zellen gegen die Zeit in Frage. Sie kann als die Rate des Farbaustritts von den Lysosomen ins Cytoplasma aufgefaßt werden. Sie ist insbesondere dann vorzuziehen, wenn große und stark variierende y-Achsenabschnitte auftreten.

Praktische Verwendbarkeit der Ergebnisse

In dem Forschungsvorhaben konnten keine eindeutigen Hinweise auf eine höhere Kupfertoleranz bei *Allolobophora thaleri* gegenüber *Aporrectodea rosea* auf der zellulären Ebene gefunden werden. Aufgrund der Tatsache, daß *Allolobophora thaleri* auf kupferkontaminierten Flächen höhere Abundanzen erreicht als auf nicht kontaminierten, während *Aporrectodea rosea* und *Aporrectodea caliginosa* auf den kontaminierten Flächen stark zurückgehen und im Extremfall sogar fehlen, muß man allerdings dennoch von einer höheren Kupfertoleranz von *Allolobophora thaleri* ausgehen. Der Neutral-Rot-Retentions-Assay im Labor war allerdings aus Gründen, über die nur spekuliert werden kann, zum Nachweis dieser Toleranz nicht geeignet.

Die Fähigkeit von *Allolobophora thaleri*, auf stark kupferkontaminierten Flächen zu überdauern, ist durch das Vorläuferprojekt (Belotti 1997) für zahlreiche Flächen belegt. Im Zuge der Gewinnung der Regenwürmer für das vorliegende Projekt sowie im Rahmen einer am Institut für Bodenkunde der Universität Hohenheim laufenden Diplomarbeit wurde das mengenmäßig bedeutende Vorkommen der Art auf kupferkontaminierten Flächen bestätigt. Damit kommt die Art als Ersatz für die empfindlicheren *Aporrectodea*-Arten auf kupferkontaminierten Flächen in Frage. Zu prüfen bleibt allerdings, ob sie diese in ihren Funktionen voll ersetzen kann und welche Sekundäreffekte einer Ausbringung zu erwarten sind. Für die Funktion Gefügebildung wird dies in der erwähnten Diplomarbeit, bei deren Betreuung das IFAB Institut für Angewandte Bodenbiologie GmbH mitwirkt, derzeit geprüft. Dabei zeichnet sich ab, daß *Allolobophora thaleri* *Aporrectodea caliginosa* und *Aporrectodea* in dieser Funktion voll ersetzen kann.

Literatur

- Belotti, E. (1997). Beeinträchtigung des Bodens als Filter und Puffer für Schadstoffe gegenüber endogäischen Regenwürmern. Forschungsprojekt im Auftrag des Landes Baden-Württemberg. Abschlußbericht. 72 S. + Anhang.
- Belotti, E. (1998). Assessment of a soil quality criterion by means of a field survey. *Applied Soil Ecology* 10, 51-63.
- Bengtsson, G., H. Ek, S. Rundgren (1992). Evolutionary response of earthworms to long-term metal exposure. *Oikos* 63, 289-297.
- Curry, J.P., Cotton, D.C.F. (1980). Effects of heavy pig slurry contamination on earthworms in grassland. In: Dindal, D.L. (Ed.). *Soil biology as related to land use practices*. US-EPA, Washington, 336-343.
- Donker, M.H., C.G. Bogert (1991). Adaptation to cadmium in three populations of the isopod *Porcellio scaber*. *Comp. Biochem. Physiol. C* 100, 143-146.
- Eyambe, G., A.J. Goven, L.C. Fitzpatrick, B. J. Venables (1991). A non-invasive technique for sequential collection of earthworm (*Lumbricus terrestris*) leukocytes during sub-chronic immunotoxicity studies. *Lab. Animals* 25, 61-67.
- Fugère, N., P. Brousseau, K. Krzystyniak, D. Coderre, M. Fournier (1996). Heavy metal-specific inhibition of phagocytosis and different in vitro sensitivity of heterogeneous coelomocytes from *Lumbricus terrestris* (Oligochaeta). *Toxicology* 109, 157-166.
- Goven, A.J., S.C. Chen, L.C. Fitzpatrick, B.J. Venables (1994). Lysozyme activity in earthworm (*Lumbricus terrestris*) coelomic fluid and coelomocytes: Enzyme assay for immunotoxicity of xenobiotics. *Environ. Toxicol. Chem.* 13, 607-613.
- Harreus, D., H.-R. Köhler, J.M. Weeks (1997). Combined non-invasive cell isolation and neutral-red retention assay for measuring the effects of copper on the lumbricid *Aporrectodea* (Savigny). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 59, 44-49.
- Huggett, R.J., R.A. Kimerle, P.M. Mehrle, Jr., H.L. Bergman (1992). *Biomarkers. Biochemical, physiological and histological markers of anthropogenic stress*. Lewis, Boca Raton, Fl.
- Klerks, P.L., J.S. Levinton (1989). Rapid evolution of metal resistance in a benthic oligochaeta inhabiting a metal-polluted site. *Biol. Bull.* 176, 135-141.
- Lowe, D.M., M.N. Moore, B.M. Evans (1992). Contaminant impact on interactions of molecular probes with lysosomes in living hepatocytes from dab *Limanda limanda*. *Mar. Ecol. Progr. Ser.* 91, 135-140.
- Ma, W. (1988). Toxicity of copper to lumbricid earthworms in sandy agricultural soils amended with Cu-enriched organic waste materials. *Ecol. Bull. (Copenhagen)* 39, 53-56.
- Morgan, J.E., C.G. Norey, A.J. Morgan, J. Kay (1989). A comparison of cadmium-binding proteins isolated from the posterior alimentary canal of the earthworms *Dendrodrilus rubidus* and *Lumbricus rubellus*. *Comp. Biochem. Physiol. C* 92, 15-21.

- Peters, W., V. Walldorf (1986). *Der Regenwurm – Lumbricus terrestris L.* Quelle & Meyer, Heidelberg, 174 S.
- Posthuma, L., N.M. van Straalen (1993). Heavy-metal adaptation in terrestrial invertebrates: a review of occurrence, genetics and ecological consequences. *Comp. Biochem. Physiol.* 106C, 11-38.
- Posthuma, L., R.F. Hogervorst, N.M. van Straalen (1992). Heavy-metal adaptation in terrestrial invertebrates: a review of occurrence, genetics and ecological consequences. *Evolution* 47, 619-631.
- Reinecke, S.A., M.W. Prinsloo, A.J. Reinecke (1999). Resistance of *Eisenia fetida* (Oligochaeta) to cadmium after long-term exposure. *Ecotoxicol. Environ. Safety* 42, 75-80.
- Richmond, L., A. Beeby (1992). A comparative study of lead uptake by three populations of the snail *Helix aspersa* Müller. *Polish J. Environ. Studies* 1, 9-13.
- Sachs, L. (1988). *Statistische Methoden: Planung und Auswertung.* 6. Auflage, Springer Berlin.
- Salagovic, J., J. Gilles, L. Verschaeve, I. Kalina (1996). The comet assay for the detection of genotoxic damage in the earthworms: a promising tool for assessing the biological hazards of polluted sites. *Folia Biologica (Praha)* 42, 17-21.
- Suzuki, K.T., M. Yamamura, T. Mori (1980). Cadmium-binding proteins induced in the earthworm. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 9, 415-424.
- Svendsen, C., A.A. Meharg, P. Freestone, J.M. Weeks (1996). Use of an earthworm lysosomal biomarker for the ecological assessment of pollution from an industrial plastics fire. *Appl. Soil. Ecol.* 3, 99-107.

Anhang: Testprotokolle

1. Termin:

Aporrectodea rosea (Savigny)

R 29

Tier 1: 205 Minuten, 31-55 Coelomozyten

Zeit (Minuten)	Verfärbte Zellen (%)
4	21,8
8	31,6
36	7,1
67	21,2
75	27,5
95	32,3
129	39,3
205	57,2

Tier 2: 175 Minuten, 15-27 Coelomozyten

Zeit (Minuten)	Verfärbte Zellen (%)
4	15,8
9	22,7
17	33,3
31	27,3
61	22,2
93	6,3
108	31,6
118	12,5
139	18,8
175	6,7

Tier 3: 144 Minuten, 13-18 Coelomozyten

Zeit (Minuten)	Verfärbte Zellen (%)
3	5,6
23	17,6
42	12,5
68	11,1
90	11,1
103	11,1
144	11,1

Tier 4: Zu wenig Coelomozyten

Tier 5: 100 Minuten, 18-27 Coelomozyten

Zeit (Minuten)	Verfärbte Zellen (%)
4	45,2
12	41,0
27	26,3
43	28,0
77	17,5
100	37,5

Tier 6: 155 Minuten, 27-40 Coelomozyten

Zeit (Minuten)	Verfärbte Zellen (%)
3	37,5
12	21,4
28	11,1
42	18,8
75	11,1
118	16,7
155	15,8

M20Tier 1: 136 Minuten, 30-47 Coelomozyten

Zeit (Minuten)	Verfärbte Zellen (%)
4	40,0
15	40,9
45	61,7
63	52,3
83	43,9
114	41,9
136	36,8

Tier 2: 112 Minuten, 15-28 Coelomozyten

Zeit (Minuten)	Verfärbte Zellen (%)
4	41,2
8	28,6
18	33,3
37	25,0
59	25,0
88	29,4
112	27,8

Tier 3: 212 Minuten, 19-22 Coelomozyten

Zeit (Minuten)	Verfärbte Zellen (%)
4	10,5
8	36,8
12	21,0
25	7,6
46	22,2
106	12,4
188	8,2
212	14,0

Tier 4: 204 Minuten, 23-47 Coelomozyten

Zeit (Minuten)	Verfärbte Zellen (%)
3	16,7
7	8,7
13	22,7
24	17,1
56	10,7
66	10,7
96	10,7
204	11,1

Tier 5: 99 Minuten, 21-36 Coelomozyten

Zeit (Minuten)	Verfärbte Zellen (%)
3	33,3
6	36,6
10	22,7
18	42,9
29	37,4
54	29,2
99	21,1

Tier 6: : 96 Minuten, 58-78 Coelomozyten

Zeit (Minuten)	Verfärbte Zellen (%)
4	16,7
10	15,4
22	19,4
32	8,6
52	11,2
74	10,2
96	10,8

Allolobophora thaleri Zicsi**R 29**Tier 1: 301 Minuten, 18-38 Coelomozyten

Zeit (Minuten)	Verfärbte Zellen (%)
3	6,2
12	4,0
41	11,1
77	19,1
114	8,3
171	6,3
209	5,6
287	13,8
301	3,8

Tier 2: 187 Minuten, 25-56 Coelomozyten

Zeit (Minuten)	Verfärbte Zellen (%)
3	7,5
9	7,1
17	7,1
43	6,4
86	16,0
124	9,1
187	9,1

Tier 3: 166 Minuten, 34-67 Coelomozyten

Zeit (Minuten)	Verfärbte Zellen (%)
3	16,4
10	22,2
19	28,2
42	9,8
78	3,8
115	17,6
166	6,5

Tier 4: Zu wenige CoelomzytenTier 5: Zu wenige CoelomzytenTier 6: Zu wenige Coelomzyten

R8Tier 1: 395 Minuten, 26-43 Coelomozyten

Zeit (Minuten)	Verfärbte Zellen (%)
3	30,7
12	45,4
33	47,8
54	43,5
85	39,4
203	29,2
269	37,5
395	17,6

Tier 2: 106 Minuten, 22-38 Coelomozyten

Zeit (Minuten)	Verfärbte Zellen (%)
2	12,9
6	2,8
12	14,4
19	11,2
31	5,9
48	2,8
70	9,1
106	8,7

Tier 3: Zu wenige CoelomozytenTier 4: 97 Minuten, 19-35 Coelomozyten

Zeit (Minuten)	Verfärbte Zellen (%)
3	5,7
6	14,3
12	14,3
22	24,0
45	16,7
62	12,2
97	16,7

Tier 5: 144 Minuten, 18-36 Coelomozyten

Zeit (Minuten)	Verfärbte Zellen (%)
3	4,8
10	11,1
22	5,0
46	3,2
83	8,3
104	11,1
144	4,8

Tier 6: : 110 Minuten, 18-31 Coelomozyten

Zeit (Minuten)	Verfärbte Zellen (%)
5	5,5
7	6,5
16	8,0
29	7,0
44	15,4
78	19,9
110	20,0

R27Tier 1: Zu wenig CoelomozytenTier 2: Zu wenig CoelomozytenTier 3: Zu wenig CoelomozytenTier 4: Zu wenig CoelomozytenTier 5: 143 Minuten, 16-27 Coelomozyten

Zeit (Minuten)	Verfärbte Zellen (%)
4	33,3
12	31,5
23	22,1
45	25,0
58	27,8
86	11,1
143	(20,0)

Tier 6: 155 Minuten, 27-40 Coelomozyten

Zeit (Minuten)	Verfärbte Zellen (%)
4	24,8
11	37,0
27	37,9
48	42,5
72	31,3
155	36,4

R9Tier 1: 352 Minuten, 22-52 Coelomozyten

Zeit (Minuten)	Verfärbte Zellen (%)
3	18,2
10	21,4
18	26,5
42	21,4
60	27,5
86	33,3
131	34,6
253	26,5
284	21,6
352	31,4

Tier 2: Zu wenige CoelomozytenTier 3: 229 Minuten, 21-48 Coelomozyten

Zeit (Minuten)	Verfärbte Zellen (%)
5	37,1
13	34,6
35	57,8
53	29,5
89	21,2
104	51,7
144	41,7
229	38,1

Tier 4: 197 Minuten, 12-22 Coelomozyten

Zeit (Minuten)	Verfärbte Zellen (%)
3	0,0
15	20,0
46	(16,7)
87	15,8
114	22,7
197	11,1

Tier 5: 181 Minuten, 13-19 Coelomozyten

Zeit (Minuten)	Verfärbte Zellen (%)
4	6,3
35	(7,6)
53	15,8
90	0
130	12,5
181	5,9

Tier 6: 124 Minuten, 17-26 Coelomozyten

Zeit (Minuten)	Verfärbte Zellen (%)
5	29,4
17	29,4
28	20,0
46	23,1
77	29,2
98	20,8
124	15,0

2. Termin

Aporrectodea rosea

M20: Behandlungsart K (kontaminiert)

Tier 1: 111 Minuten, 14-63 Coelomozyten

Zeit (Minuten)	Verfärbte Zellen (%)
3	0
8	0
17	5,5
22	5,9
45	1,8
72	(0)
94	0
111	0

Tier 2: 142 Minuten, 27-43 Coelomozyten

Zeit (Minuten)	Verfärbte Zellen (%)
5	2,3
12	13,5
22	20,6
34	16,7
68	14,8
88	13,3
142	7,7

Tier 3: 170 Minuten, 19-30 Coelomozyten

Zeit (Minuten)	Verfärbte Zellen (%)
3	25,0
18	7,4
64	36,8
88	20,0
102	43,5
146	40,7
170	30,8

Tier 4: 134 Minuten, 14-20 Coelomozyten

Zeit (Minuten)	Verfärbte Zellen (%)
5	0
25	5,3
55	10,0
98	0
119	0
134	(0)

Tier 5: 129 Minuten, 36-122 Coelomozyten

Zeit (Minuten)	Verfärbte Zellen (%)
2	19,4
10	22,1
17	23,5
36	33,3
60	28,8
107	31,6
129	35,2

Tier 6: Zu wenige Coelomozyten**M20 Behandlungsart U (nicht kontaminiert)**Tier 1: 112 Minuten, 32-63 Coelomozyten

Zeit (Minuten)	Verfärbte Zellen (%)
2	5,9
8	2,4
14	4,5
37	25,0
81	17,5
112	13,5

Tier 2: Zu wenige Coelomozyten

Tier 3: 129 Minuten, 32-59 Coelomozyten

Zeit (Minuten)	Verfärbte Zellen (%)
3	12,2
10	12,5
18	24,5
32	12,2
56	17,5
78	28,0
129	25,0

Tier 4: 145 Minuten, 23-32 Coelomozyten

Zeit (Minuten)	Verfärbte Zellen (%)
4	0
13	9,4
24	10,0
38	0
65	7,2
145	13,0

Tier 5: 231 Minuten, 19-38 Coelomozyten

Zeit (Minuten)	Verfärbte Zellen (%)
3	0
19	0
36	0
77	7,9
152	13,2
231	7,1

Tier 6: 203 Minuten, 18-33 Coelomozyten

Zeit (Minuten)	Verfärbte Zellen (%)
2	0
16	3,0
25	4,5
75	16,0
134	11,1
203	7,7

Allolobophora thaleri**R8 Behandlungsart K (kontaminiert)**Tier 1: 101 Minuten, 16-21 Coelomozyten

Zeit (Minuten)	Verfärbte Zellen (%)
4	11,8
12	9,5
23	4,8
43	11,1
68	5,9
87	4,8
101	6,3

Tier 2: 126 Minuten, 27-47 Coelomozyten

Zeit (Minuten)	Verfärbte Zellen (%)
3	17,9
13	20,5
23	27,0
61	21,3
91	27,3
126	33,3

Tier 3: Zu wenige CoelomozytenTier 4: 217 Minuten, 17-24 Coelomozyten

Zeit (Minuten)	Verfärbte Zellen (%)
4	23,5
11	17,6
24	11,8
49	8,3
103	16,7
217	19,1

Tier 5: Zu wenige CoelomozytenTier 6: 114 Minuten, 15-21 Coelomozyten

Zeit (Minuten)	Verfärbte Zellen (%)
2	20,0
14	19,0
44	23,5
68	22,2
92	10,5
114	21,1

R8 Behandlungsart U (nicht kontaminiert)Tier 1: 118 Minuten, 20-27 Coelomozyten

Zeit (Minuten)	Verfärbte Zellen (%)
2	0
12	5,9
46	4,2
59	14,8
97	14,3
118	20,0

Tier 2: 124 Minuten, 11-17 Coelomozyten

Zeit (Minuten)	Verfärbte Zellen (%)
2	(45,4)
8	(28,8)
18	43,8
36	13,3
53	(16,7)
89	17,6
124	31,3

Tier 3: 211 Minuten, 15-27 Coelomozyten

Zeit (Minuten)	Verfärbte Zellen (%)
3	4,5
19	18,5
60	11,8
92	6,7
167	0
211	14,3

Tier 4: 111 Minuten, 38-44 Coelomozyten

Zeit (Minuten)	Verfärbte Zellen (%)
2	27,3
8	33,3
16	28,9
25	26,2
49	44,7
72	47,5
111	35,7

Tier 5: 104 Minuten, 24-29 Coelomozyten

Zeit (Minuten)	Verfärbte Zellen (%)
3	11,1
10	20,7
26	16,0
53	22,2
77	20,8
104	15,4

Tier 6: 149 Minuten, 18-25 Coelomozyten

Zeit (Minuten)	Verfärbte Zellen (%)
1	18,2
8	38,1
17	52,2
34	22,2
55	33,3
86	28,0
104	17,4
149	21,7

R9 Behandlungsart K (kontaminiert)Tier 1: 112 Minuten, 17-27 Coelomozyten

Zeit (Minuten)	Verfärbte Zellen (%)
1	11,1
9	25,0
30	18,2
42	23,5
58	24,6
112	13,6

Tier 2: 108 Minuten, 57-135 Coelomozyten

Zeit (Minuten)	Verfärbte Zellen (%)
7	21,0
13	23,8
29	20,9
49	24,4
84	20,0
108	18,0

Tier 3: 163 Minuten, 57-78 Coelomozyten

Zeit (Minuten)	Verfärbte Zellen (%)
2	17,6
7	17,6
16	14,3
27	19,3
43	12,3
62	14,4
94	16,7
131	5,6
163	6,6

Tier 4: 151 Minuten, 72-102 Coelomozyten

Zeit (Minuten)	Verfärbte Zellen (%)
4	11,8
11	17,6
27	10,4
48	23,3
77	16,7
102	19,5
151	30,5

Tier 5: 202 Minuten, 66-88 Coelomozyten

Zeit (Minuten)	Verfärbte Zellen (%)
3	8,0
9	0
21	4,4
38	4,7
63	9,1
93	12,5
136	7,3
173	6,3
202	6,1

Tier 6: 205 Minuten, 152-202 Coelomozyten

Zeit (Minuten)	Verfärbte Zellen (%)
4	14,7
30	31,1
58	18,0
94	11,8
131	13,4
180	13,1
205	23,3

R9 Behandlungsart U (nicht kontaminiert)Tier 1: 184 Minuten, 115-143 Coelomozyten

Zeit (Minuten)	Verfärbte Zellen (%)
7	3,5
12	5,3
42	1,6
69	8,5
100	6,6
132	4,8
152	6,5
184	8,4

Tier 2: 98 Minuten, 111-192 Coelomozyten

Zeit (Minuten)	Verfärbte Zellen (%)
2	0
8	1,4
19	0
37	0
62	0
98	0

Tier 3: 114 Minuten, 140-179 Coelomozyten

Zeit (Minuten)	Verfärbte Zellen (%)
3	2,2
9	1,4
17	0,6
32	2,6
52	1,3
78	4,3
99	5,4
114	2,5

Tier 4: 106 Minuten, 52-70 Coelomozyten

Zeit (Minuten)	Verfärbte Zellen (%)
4	22,9
12	57,1
20	35,7
35	44,2
47	53,1
72	52,8
106	43,3

Tier 5: 178 Minuten, 77-91 Coelomozyten

Zeit (Minuten)	Verfärbte Zellen (%)
2	4,8
14	1,3
44	2,6
69	5,6
101	6,5
133	4,7
178	5,5

Tier 6: 149 Minuten, 98-181 Coelomozyten

Zeit (Minuten)	Verfärbte Zellen (%)
3	24,8
18	40,6
49	22,9
94	46,8
120	50,3
149	51,6

3. Termin

Aporrectodea rosea

M20 Behandlungsart K (kontaminiert)

Tier 1: 127 Minuten, 29-45 Coelomozyten

Zeit (Minuten)	Verfärbte Zellen (%)
2	5,4
9	7,8
21	7,8
38	8,9
88	7,3
127	5,0

Tier 2: 145 Minuten, 42-58 Coelomozyten

Zeit (Minuten)	Verfärbte Zellen (%)
5	7,8
13	17,0
22	16,7
46	18,2
85	15,5
107	14,6
145	14,9

Tier 3: Zu wenige Coelomozyten

Tier 4: 122 Minuten, 25-35 Coelomozyten

Zeit (Minuten)	Verfärbte Zellen (%)
1	20,0
7	12,5
20	6,9
32	7,8
47	19,4
69	11,4
88	14,8
122	7,8

Tier 5: Zu wenige Coelomozyten

Tier 6: 105 Minuten, 81-103 Coelomozyten

Zeit (Minuten)	Verfärbte Zellen (%)
2	8,6
9	5,8
19	11,2
57	8,6
76	7,9
105	8,7

M20 Behandlungsart U (nicht kontaminiert)Tier 1: 97 Minuten, 19-42 Coelomozyten

Zeit (Minuten)	Verfärbte Zellen (%)
2	0
13	7,4
24	5,3
42	9,5
72	6,9
97	12,5

Tier 2: 135 Minuten, 24-28 Coelomozyten

Zeit (Minuten)	Verfärbte Zellen (%)
4	4,0
11	11,1
28	10,7
59	7,4
98	0
135	12,5

Tier 3: 99 Minuten, 22-31 Coelomozyten

Zeit (Minuten)	Verfärbte Zellen (%)
2	6,9
8	9,4
21	0
43	10,0
69	6,9
99	11,1

Tier 4: 131 Minuten, 26-43 Coelomozyten

Zeit (Minuten)	Verfärbte Zellen (%)
3	4,5
10	7,4
22	12,9
33	10,3
66	16,0
91	7,4
112	12,9
131	11,5

Tier 5: 109 Minuten, 27-43 Coelomozyten

Zeit (Minuten)	Verfärbte Zellen (%)
1	6,5
15	4,7
25	0
60	12,0
82	24,1
109	11,4

Tier 6: 134 Minuten, 49-67 Coelomozyten

Zeit (Minuten)	Verfärbte Zellen (%)
2	0
11	14,9
32	3,4
57	3,8
71	3,1
106	0
134	3,8

Allolobophora thaleri**R8 Behandlungsart K (kontaminiert)**Tier 1: 122 Minuten, 27-44 Coelomozyten

Zeit (Minuten)	Verfärbte Zellen (%)
3	4,5
14	0
37	7,4
58	12,9
87	3,4
122	10,5

Tier 2: 151 Minuten, 52-71 Coelomozyten

Zeit (Minuten)	Verfärbte Zellen (%)
4	0
17	1,4
38	3,8
76	1,5
104	0
122	6,8
151	1,5

Tier 3: 114 Minuten, 44-62 Coelomozyten

Zeit (Minuten)	Verfärbte Zellen (%)
3	3,5
12	2,3
42	0
67	4,3
93	6,5
114	2,0

Tier 4: Zu wenige CoelomozytenTier 5: 119 Minuten, 49-66 Coelomozyten

Zeit (Minuten)	Verfärbte Zellen (%)
2	3,0
8	4,7
22	6,9
39	0
60	11,1
82	8,2
119	3,6

Tier 6: 142 Minuten, 51-67 Coelomozyten

Zeit (Minuten)	Verfärbte Zellen (%)
3	11,3
7	7,4
18	22,9
32	17,3
67	9,8
99	17,8
142	7,8

R8 Behandlungsart U (nicht kontaminiert)Tier 1: 114 Minuten, 42-57 Coelomozyten

Zeit (Minuten)	Verfärbte Zellen (%)
3	4,2
10	2,4
23	3,5
38	9,1
54	4,3
87	7,7
114	7,0

Tier 2: 133 Minuten, 58-78 Coelomozyten

Zeit (Minuten)	Verfärbte Zellen (%)
3	2,9
8	4,7
16	3,0
33	6,9
57	5,8
92	1,4
133	5,1

Tier 3: 104 Minuten, 45-68 Coelomozyten

Zeit (Minuten)	Verfärbte Zellen (%)
4	4,7
11	11,1
25	8,6
47	8,9
63	3,0
104	11,8

Tier 4: 98 Minuten, 39-56 Coelomozyten

Zeit (Minuten)	Verfärbte Zellen (%)
3	2,7
7	18,8
19	21,4
32	11,1
48	10,6
98	5,8

Tier 5: Zu wenige CoelomozytenTier 6: Zu wenige Coelomozyten

R9 Behandlungsart K (Kontaminiert)Tier 1: 147 Minuten, 39-60 Coelomozyten

Zeit (Minuten)	Verfärbte Zellen (%)
3	0
10	1,9
22	4,3
37	0
58	3,3
96	5,8
147	0

Tier 2: 101 Minuten, 48-71 Coelomozyten

Zeit (Minuten)	Verfärbte Zellen (%)
3	3,0
9	7,0
23	0
47	5,6
69	4,2
101	7,1

Tier 3: 96 Minuten, 44-67 Coelomozyten

Zeit (Minuten)	Verfärbte Zellen (%)
2	4,2
11	6,0
27	0
43	9,1
72	3,8
96	9,5

Tier 4: 128 Minuten, 42-57 Coelomozyten

Zeit (Minuten)	Verfärbte Zellen (%)
4	2,4
12	5,3
28	3,9
44	7,4
68	4,1
92	10,6
128	6,0

Tier 5: 117 Minuten, 61-88 Coelomozyten

Zeit (Minuten)	Verfärbte Zellen (%)
4	4,1
10	0
39	2,5
58	3,7
79	2,8
117	3,0

Tier 6: 99 Minuten, 32-46 Coelomozyten

Zeit (Minuten)	Verfärbte Zellen (%)
3	2,7
7	4,8
15	2,5
31	4,0
48	5,7
99	4,3

R9 Behandlungsart U (nicht kontaminiert)Tier 1: 109 Minuten, 23-43 Coelomozyten

Zeit (Minuten)	Verfärbte Zellen (%)
4	4,8
9	8,7
19	3,7
33	6,7
54	2,3
76	5,1
109	0

Tier 2: 98 Minuten, 22-31 Coelomozyten

Zeit (Minuten)	Verfärbte Zellen (%)
4	9,6
10	3,2
21	7,4
37	9,6
56	14,5
98	6,9

Tier 3: 97 Minuten, 38-51 Coelomozyten

Zeit (Minuten)	Verfärbte Zellen (%)
3	5,9
12	4,3
23	5,3
40	4,3
64	4,5
97	2,7

Tier 4: 108 Minuten, 17-25 Coelomozyten

Zeit (Minuten)	Verfärbte Zellen (%)
3	8,0
13	17,6
25	22,2
48	10,5
71	17,6
108	22,2

Tier 5: 96 Minuten, 28-43 Coelomozyten

Zeit (Minuten)	Verfärbte Zellen (%)
1	4,8
8	5,1
17	14,3
26	7,8
41	6,9
64	2,3
96	5,4

Tier 6: 111 Minuten, 36-48 Coelomozyten

Zeit (Minuten)	Verfärbte Zellen (%)
3	4,2
15	2,8
34	9,5
59	5,6
85	7,3
111	2,2