Die inkorporering van biomerkers in die assessering van die ekologiese risiko van chemiese bodemkontaminante

Incorporating biomarkers in ecological risk assessment of chemical contaminants of soils

AJ Reinecke[1], SA Reinecke[1], MS Maboeta[2], JP Odendaal[3] & R Snyman[4]

1. Departement Plant- en Dierkunde, Universiteit van Stellenbosch, Privaat sak X1, Matieland, 7602.
2. Skool vir Omgewingswetenskap en Ontwikkeling, Noordwes-Universiteit, Potchefstroom.
3. Departement Omgewings- en Beroepsgesondheidstudies, en
4. Departement Biodiversiteit en Bewaring, Kaapse Skiereiland Universiteit van Tegnologie.

Prof. AJ Reinecke
ajr@sun.ac.za

ABSTRACT

Incorporating biomarkers in ecological risk assessment of chemical contaminants of soils

Soil is an important but complex natural resource which is increasingly used as sink for chemicals. The monitoring of soil quality and the assessment of risks posed by contaminants have become crucial. This study deals with the potential use of biomarkers in the monitoring of soils and the assessment of risk resulting from contamination. Apart from an overview of the existing literature on biomarkers, the results of various of our field experiments in South African soils are discussed.

Biomarkers may have potential in the assessment of risk because they can indicate at an early stage that exposure has taken place and that a toxic response has been initiated. It is therefore expected that early biomarkers will play an increasing role as diagnostic tools for determining exposure to chemicals and the resulting effects. They may have predictive value that can assist in the prevention or minimising of risks.

The aim of this study was to investigate the possibilities of using our results on biomarker responses of soil dwelling organisms to predict changes at higher organisational levels (which may have ecological implications). Our recent experimental results on the evaluation of various biomarkers in both the laboratory and the field are interpreted and placed in perspective within the broader framework of response biology. The aim was further to contribute to the development and application of biomarkers in regulatory risk assessment schemes of soils.

This critical review of our own and recent literature on biomarkers in ecotoxicology leads to the conclusion that biomarkers can, under certain conditions, be useful tools in risk assessment. Clear relationships between contamination loads in soil organisms and certain biomarker responses were determined in woodlice, earthworms and terrestrial snails. Clear correlations were also established in field experiments between biomarker responses and changes at the population level. This indicated that, in spite of the fact that direct mechanistic links are still not clarified, biomarkers may have the potential to provide early indications of forthcoming changes at higher organisational levels.

Ways are proposed in which biomarkers could be used in the future in risk assessment schemes of soils and future research directions are suggested.

KEY CONCEPTS: Biomarkers, soils, chemical contaminants, ecological risk
TREFWOORDE: Biomerkers, grond, chemiese besoedelstowwe, ekologiese risiko

---

OPSOMMING
Grond is ’n belangrike, maar komplekse natuurlike hulpbron wat toenemend as reservoir van chemiese stowwe dien. Die monitering van grondkwaliteit en die assessering van die risiko’s wat kontaminasie meebring, het van kardinale belang geword. Hierdie studie handel oor die moontlike aanwending van biomerkers in die monitering van gronde en in die bepaling van die risiko’s wat kontaminasie inhou. Afgesien van ’n oorsig oor die bestaande vakliteratuur oor biomerkers, word die resultate van verskeie veldproewe waarin biomerkers gebruik is en wat afsonderlik uitgevoer is in Suid-Afrikaanse gronde, geïntegreerd weergegee.

Bepaling van blootstelling sowel as effekte is belangrik in risiko-assessering. Daarom het biomerkers potensiaal in die assesseringsproses omdat dit vroeg reeds kan aantoon of blootstelling wel plaasgevind het en of ’n toksiese respons geïnisieer is. Gevolglik word verwag dat vroeë biomerkers ’n toenemend belangrike rol sal speel as diagnostiese hulpmiddels vir die bepaling van blootstelling aan chemiese stowwe en die daaropvolgende effekte. Die vraag word aangespreek of dit voorspellingsmoontlikhede bied wat kan help om risiko’s te voorkom of te minimaliseer.

Die doel van hierdie studie was om die moontlikhede te ondersoek om ons resultate oor biomerkerresponse van verskillende grondlewende organismes te gebruik om veranderinge op hoër organisatoriese vlakke (wat ekologiese implikasies mag inhou), te voorspel. Ons onlangse eksperimentele resultate oor die evaluering van verskeie biomerkers in sowel die veld as die laboratorium word geïnterpreteer en in perspektief geplaas met die breë konseptuele raamwerk van responsbiologie. Die oogmerk was voorts om ’n bydrae te lewer tot die ontwikkeling en aanwending van biomerkers in regulatoriese risiko-assesseringskemas van gronde.

Hierdie kritiese oorsig van eie bevindinge en die onlangse literatuur, lei tot die slotsom dat, hoewel heelwat ontwikkeling nog gedoen moet word, hierdie hulpmiddels onder bepaalde voorwaardes van groot nut kan wees in risiko-assessering. Duidelike verbande tussen kontaminasievlakke in grondorganismes en bepaalde biomerkerresponse is vasgestel vir houtluise, erdwurms en landslakke. Duidelike korrelasies is ook in veldeksperimente gevind tussen biomerkerresponse en veranderinge op bevolkingsvlak. Hoewel direkte, meganistiese verbande tussen biomerkerresponse en latere veranderinge op hoër organisatoriese vlakke nog ontbreek, dui die resultate daarop dat biomerkers wel die potensiaal het om as vroeë aanduiders te kan dien van sodanige veranderinge. ’n Wyse word voorgestel waarvolgens biomerkers in toekomstige risiko-assesseringskemas vir gronde ingesluit kan word en verdere navorsingsdoelwitte word uitgewys.

1. INLEIDING

In teenstelling met die omvangryke belangstelling en mediablootstelling wat omgewingsbesoedeling in die sewentiger- en tagtigerjare wêreldwyd gekry het, het dit in die onlangse dekade minder in die brandpunt gekom. Die opbloei van bedrywe in bioprodukte dui daarop dat daar wel ’n groeiende bewussyn by die publiek is oor die gevare van besoedelstowwe.

Wanneer chemiese verbindings in die natuurlike omgewing beland of moontlik kan beland, is die eerste vraag gewoonlik: watter risiko hou dit in vir die mens en sy biologiese omgewing? Om hierdie risiko betroubaar te bepaal, is geen eenvoudige saak nie omdat daar ook van korttermyn- sowel as langtermynrisiko sprake kan wees, wat voorspellings op sigself riskant maak omdat dit omvangryke implikasies mag hê indien bestuursbesluite daarop gebaseer word.

Die ideaal is natuurlik dat alarm op die vroegs moontlike tydstip gemaak kan word indien gevaar op ekostelselvlak dreig. So ’n alarm moet nie vals wees nie en op goeie gronde berus. Deur die meting van stresresponse by organismes op sellulêre of subsellulêre vlak kan die eerste aanduidings van blootstelling en/of effekte waargeneem word. Na hierdie tipe metings word

gewoonlik verwys as biomerkers. Vir die doel van hierdie studie word hierdie definisie, soos meer uitgebreid uiteengesit in Van Gestel en Van Brummelen[1] aanvaar. Die kernvraag is dan of hierdie biomerkers voorspellingswaarde het van wat op ekostelselvlak mag volg.

Sonder blootstelling en sonder dat 'n chemiese verbinding die inherente vermoë het om skade te veroorsaak, kan daar nie sprake wees van risiko nie. Die proses van risiko-assessering begin dus by die vraag of blootstelling wel plaasvind. Maar, soos reeds deur verskeie navorsers[2,3] aangetoon is, beteken die blote teenwoordigheid van 'n verbinding in die omgewing nie noodwendig dat dit in fisieke kontak met die organisme kom en opgeneem word nie en dat daar dus effektiewe, interne blootstelling is nie. Dit is veral van toepassing op die grondomgewing met sy heterogene samestelling en omvangryke variasie van plek tot plek.

Ten spyte van 'n moderne bewustheid van die potensiële gevare van chemiese besoedeling, gaan kontaminasie van veral gronde steeds voort. Die rede hiervoor is waarskynlik geleë in die feit dat die impak en implikasies van sodanige blootstelling tydelik uitgestel word omdat die grond dikwels as reservoir of tydelike bergplek kan dien. Afgesien van geologiese neerslae wat op die oppervlak van die aarde ontbloot word deur mynaktiwiteite, dra verskeie ander menslike aktiwiteite steeds by tot die probleem van direkte blootstelling aan xenobiotiese stowwe.[4] Lood in motorbrandstof is 'n bekende voorbeeld terwyl kadmium, wat deur verskeie industrieë gebruik word, ook as besoedelstof in baie omgewings voorkom.[5] Volgens Lowe et al[6] is daar 'n magdom getuienis beskikbaar wat aantoon dat chemikalieë soos metale óf afsonderlik óf in kombinasie nadelig is vir organismes. Spurgeon en Hopkin[7] bevestig dit ook ten opsigte van grondlewende invertebrate soos erdwurms.

Die grondomgewing en die response van grondorganismes op besoedelstowwe is tot dusver minder intensief deur ekotoksikoloë bestudeer as die wateromgewing, ten spyte daarvan dat alle water een of ander tyd deur grond beweeg in die normale ekologiese kringlope op aarde. Grond is 'n belangrike natuurlike hulpbron en in Suid-Afrika is gronde wat vir landboudoeleindes en gewasverbouing geskik is, uiters skaars.[55] Dit verteenwoordig maar 'n baie klein persentasie van die totale Suid-Afrikaanse grondoppervlak. Gevolglik is die beskerming van ons gronde en hulle grondvrugbaarheid teen toksiese kontaminasie van uiterste belang.

Ekotoksikologiese risiko-analise van kontaminante is grootliks afhanklik van ekstrapolasies, dus is die toepassing daarvan op grondomgewings vol slaggate. Deur die gebruik van sensitiwiteitsgegewens[8] vir verskeie spesies en regressietegnieke, is verskeie modelle reeds voorgestel.[9,10,11,12] Op een of ander wyse is hierdie ekstrapolasiemodelle afhanklik van sekere subjektiewe prosedurele en fundamentele aannames of oordele. Besluite moet geneem word oor geen-effek-konsentrasies (Eng. NOEC), die kwaliteit van die insetgegewens, die veiligheids- of beskermingsvlak; die keuse van spesies op grond van hulle gevoeligheid en verteenwoordigheid (om verskillende fisiologiese meganismes, opnameroetes en ekotipes in te sluit), ekstrapolasie-faktore wat toegepas word tussen laboratorium- en veldresultate, die grootte van die veiligheids- of beskermingsvlak wat toegepas gaan word om 'n sekere aantal spesies te beskerm, die normalisering van die gegewens vir die verskille in eienskappe van verskillende gronde.

Bogenoemde werkswyses kan verkort of verfyn word indien alternatiewe metodes wat van biomerkers gebruik maak, ontwikkel kan word. So mag biomerkerresponse eerder as LD50-waardes 'n meer akkurate en beter basis bied om sensitiwiteite van verskillende spesies te vergelyk. Die rede daarvoor is dat die vergelyking nie tussen morfologies en fisiologies uiteenlopende heel-organismes is nie, maar tussen naastenby soortgelyke selle of subsellulêre prosesse by verskillende spesies. Die daarstelling van spesies-sensitiwiteitsverspreidings[13] wat op biomerkerresponse gebaseer is, sou hiervolgens dus van groter nut kon wees as dié wat op LD50-waardes of dergelike eindpunte gebaseer is.

Aangesien biomerkerresponse direk verband hou met die biobeskikbaarheid van chemiese verbindings, is hulle reeds voorgestel[14] vir skanderingsdoeleindes in besoedelde gebiede. Hulle aanwending was tot dusver baie beperk weens onsekerheid omtrent hulle inherente responsvariasie en weens ’n gebrek aan kalibrasie in terme van kousaalgekoppelde, ekologies relevante eindpunte.[15,16,17] ’n Skaarste aan toepaslike gegewens waarop sodanige afleidings gemaak en tendense gebaseer kan word, skyn die probleem te wees.

Die gebruik van stresproteïne, metallotioniene, ultrastrukturele veranderinge, isosieme en veranderinge in membraamfragiliteit[17,18] het in die afgelope jare veld gewen as potensiële werktuie om toksiese gevare te identifiseer, ook in veldstudies.[19] Die bruikbaarheid van hierdie biomerkers in risiko-assessering is nog onseker maar behoort duideliker te word soos wat meer inligting beskikbaar kom vir meer spesies se response op blootstelling aan meer kontaminante.

Die doel van hierdie studie is om ons eie resultate met bodembewonende organismes in konteks te plaas met risiko-assesseringsdoelwitte en nie om ’n volledige oorsig oor die aanwending van biomerkers in grondorganismes te bied nie. Ons wil dus die moontlikhede ondersoek om die biomerkerresponse van hierdie verskillende grondlewende organismes op blootstelling aan verhoogde konsentrasies van metale in verband te bring met sowel liggaamsladings van die metale as met veranderinge op hoër organisatoriese vlakke wat ekologiese implikasies mag inhou. Die eksperimentele resultate van ons laboratorium- sowel as veldstudies oor die uitwerking van besoedelstowwe op bevolkingsgetalle van verskillende grondorganismes, is afsonderlik gepubliseer en word slegs na verwys ten einde dit in verband te bring met die biomerkerresponse waaroor hierdie artikel handel. Hierdie studie word gemik op die evaluering van die gekose biomerkers in sowel die veld as die laboratorium en word geïnterpreteer en in perspektief geplaas met die breë konseptuele raamwerk van responsbiologie. Laasgenoemde kan gesien word as ’n gebied van die omgewingsbiologie waar toenemend van die reaksies van lewende organismes (op genetiese, individuele, bevolkings- en gemeenskapsvlak) op omgewingsveranderinge (waaronder besoedeling, temperatuur, vog) gebruik gemaak word om voorspellings te maak oor ekologiese en selfs evolusionêre impakte. Enersyds is dit ’n oogmerk om vas te stel of biomerkerresponse wat verkry is ’n aanduiding kan bied dat die betrokke organismes wel blootstelling ervaar het – andersyds of die respons en daaropvolgende effekte moontlik kousaal in verband gebring kan word met effekte of verandering op hoër organisatoriese vlakke. Veranderinge in biomassa en getalle sowel as lewensloopeienskappe wat die direkte gevolg is van blootstelling, en wat saamval met biomerkerresponse, mag belangrike getuienis bied oor die waarde en gebruik van biomerkers. Die oogmerk is dus om ’n geïntegreerde bydrae te lewer tot die ontwikkeling en aanwending van biomerkers in risiko-assessering van gronde.

2. METODOLOGIE

Afgesien van ’n oorsigstudie van die primêre literatuur oor die huidige stand, ontwikkeling en aanwending van biomerkers in die grondomgewing, word eie laboratoriumresultate met biomerkers wat oor verskeie jare met verskeie spesies verkry is, heroorweeg met die oog op inskatting van die potensiaal vir risiko-assessering. Dit het gelei tot veld-evaluering of -validering as ’n belangrike volgende stap. Ondersoeke is met verskillende invertebraatspesies wat in die veld aan metaalkontaminasie blootgestel is, uitgevoer, naamlik houtluise, landslakke en erdwurms. Die spesies is gekies omdat hulle ’n belangrike rol speel en verskillende nisse in die bodem verteenwoordig. Die verskeidenheid sou nog uitgebrei kon word om ander soorte soos springsterte(Collembola), kewers (Coleoptera) en spinnekoppe in te sluit ten einde ’n meer verteenwoordigende beeld te verkry. Die metodologie word hier slegs oorsigtelik aangebied en kan meer gedetailleerd in die aangehaalde bronne nagegaan word.

2.1 Veld-evaluering van biomerkers

2.1.1 Histologiese biomerkers by die houtluis, Porcellionides pruinosus

Eksemplare van die spesie is in die oppervlakkige strooisellaag by twee persele versamel, die een ’n relatief ongekontamineerde omgewing, die Botaniese tuin van die Universiteit van Stellenbosch, en die ander direk langs ’n smeltery (33 56’ 30" E) wat gekontamineerd is. Vyftig van die grootste eksemplare vanaf elke perseel is gedissekteer om die hepatopankreas te verwyder vir histologiese ondersoek[20] deur middel van dwarssneë. Die Leica Qwin-sagtewarepakket vir beeldverwerking is gebruik om oppervlakmetings van die hepatopankreas te maak. Die oppervlak van die lumen is afgetrek van die totale oppervlak van die snee om die oppervlak wat deur die selle beslaan word, te bereken. Die oppervlak van ’n bepaalde snee wat deur selle beslaan word, is as persentasie van die totale oppervlak uitgedruk en as PCA aangedui. Die posisies van die sneë deur die hepatopankreas was vir alle eksemplare eenders, en is bepaal soos deur Odendaal en Reinecke[21] aangedui.

Metaalanalise is van grond- en strooiselmonsters en vyf eksemplare van die houtluise van elke perseel uitgevoer volgens die metodes soos beskryf deur Odendaal en Reinecke.[22] Statistiese analise is met behulp van Sigmastat uitgevoer om betekenisvolheid van waargenome verskille tussen blootgestelde en nieblootgestelde houtluise aan te toon.

2.1.2 Veldwaarnemings van lisosomale veranderings by die erdwurms Aporrectodea caliginosa en Microchaeuts sp. *in kombinasie met getalle en biomassaveranderinge*

Twee erdwurmspesies verteenwoordigend van twee verskillende families is gekies, die een uitheems (*Aporrectodea caliginosa*) en die ander inheems (*Microchaetus* sp). Erdwurms van beide spesies is onderskeidelik op twee verskillende lokaliteite ondersoek deurdat kwantitatiewe opnames van getalle en biomassas ooreenkomstig die algemeen aanvaarde werkswyse, soos beskryf deur Kula,[23] uitgevoer is. Een perseel is in Stellenbosch geleë en die ander in Nieuwoudtville. Volledige beskrywings van die werkswyse is in Maboeta et al [24,25] te vinde. In beide gevalle is wurms versamel in sowel ’n kontroleperseel wat nie enige chemiese behandeling ondergaan het nie en ’n eksperimentele perseel wat met die swamdoder koperoksichloried bespuit is teen ’n konsentrasie en frekwensie soos normaalweg voorgeskryf deur die vervaardigers. [24] Opnames van wurmgetalle en massas is aanvanklik gemaak, waarna die eerste bespuiting plaasgevind het. Daarna is opnames met tussenposes van twee maande gemaak voor elke daaropvolgende bespuiting. Finale opnames is respektiewelik ses maande en ’n jaar later gemaak. Met elke opname is die liggaamsladings van koper in die wurms bepaal deur suurverterings[26] en daaropvolgende analise met behulp van ’n Varian AA-1275-atoomabsorpsiespektrofotometer. Statistiese analise is met Sigmastat-sagteware uitgevoer.[25] Eksemplare van die wurms uit sowel die proefpersele as die kontroles is by elke geleentheid chemies ontleed en ook aan toetse vir neutraalrooiretensietye (NRR) onderwerp.[27,28]

2.1.3 Lisosomale verandering in hemosiete by die tuinslak, Helix aspersa

Tien tot dertien eksemplare van *Helix aspersa* is onderskeidelik by elk van twee wingerde in die omgewing van Stellenbosch en Somerset-Wes versamel. Eersgenoemde wingerd is normaalweg met koperoksichloried bespuit vir swambeheer terwyl die tweede as kontrole gedien het omdat dit geen geskiedenis van bespuiting het nie. Die slakke is versamel een week na die eerste bespuiting en weer twee maande na die laaste bespuiting. ’n Verteenwoordigende monster van wingerdblare en grond is ook by elke geleentheid vir chemiese analise geneem. Die neutraalrooiretensiemetode

(NRR) is direk na versameling van die slakke toegepas op die hemosiete[29] van 6 tot 10 slakke vanaf elke lokaliteit. Die slakke, grond en blare is ook chemies ontleed vir koper volgens die metode soos deur Snyman et al[43] beskryf. Statistiese analise en grafiese voorstellings is met Sigmastat 2.0 en Microsoft Excel 97 gedoen.

3. RESULTATE EN BESPREKING

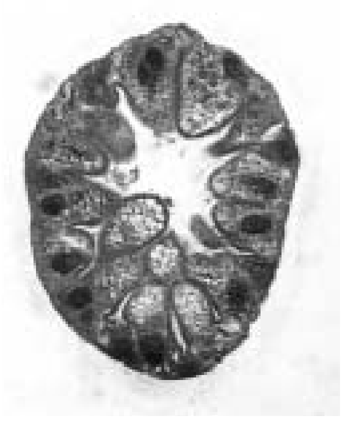
3.1 Histologiese biomerker by die houtluis, *Porcellionides pruinosus*

Die houtluise wat by ’n smeltery versamel is, het beduidend hoër konsentrasies van Cd en Zn gehad as dié afkomstig van die Botaniese tuin (tabel 1). Hierdie gekontamineerde houtluise se hepatopankreasse het opvallende degenerasie van lumenselle vertoon (figuur 1) in vergelyking met dié van organismes uit die ongekontamineerde gebied. Die daarop gebaseerde PCA-waardes was ook beduidend verskillend. Hoewel ’n dosis-responsverband oor verskeie konsentrasies nie hier geïllustreer is nie, kan dit wel as eerste aanduiding onder veldtoestande dien dat hierdie strukturele metings wel biomerkerwaarde mag hê. Dit stem ooreen met die laboratoriumbevindinge van Odendaal en Reinecke[20] wat wel ’n dosisverwante respons onder laboratoriumtoestande verkry het. Die gevolgtrekking is dat PCA moontlik as biomerker van metaalgeïnduseerde stres/effekte by houtluise onder veldtoestande gebruik kan word indien die nodige kontroles in plek is en dit oor ’n konsentrasiegradiënt bevestig kan word. Die praktiese uitvoerbaarheid daarvan as roetinemetode is beperk weens die omvattende histologiese prosedures wat vereis word. Die mate waarin hierdie biomerker aanduidend kan wees van veranderinge in lewensloopparameters en ander effekte op hoër organisatoriese vlakke, is nie ondersoek nie. Die duidelike verband wat wel ook in laboratoriumproewe[30] met *Porcellio laevis* geïllustreer is tussen metaalkonsentrasies in die hepatopankreas en die verandering in die PCA, kan ook uit figuur 1 afgelei word waar die ooglopende verandering in die deursnee van die blootgestelde houtluis se hepatopankreas opvallend is.

TABEL 1: PCA-waardes (n=40) en die gemiddelde kadmiumkonsentrasies (ì g.g^{-1}; droë massa) (±SA) in grond, strooisel (blare) en die hepatopankreas van die houtluis, *P. pruinosus* in ’n gekontamineerde perseel digby ’n smeltery en ’n ongekontamineerde perseel.[20] Omvang in [hakies]. n=5 (analises), NM = nie meetbaar, PCA = sel-oppervlak as persentasie van totale oppervlak

	Kadmium (ì g.g^{-1})			
	Grond	**Blare**	**Hepatopankreas**	**PCA***
Ongekon-tamineerd	NM	NM	NM	84.2 (±5.3) [76.6 – 94.9]
Gekon-tamineerd.	4.2 (±2.9) [2.0-7.5]	6.7 (±1.4) [5.9-8.3]	89.9 (±7.6) [81.6-98.4]	55.9 (±11.4) [33.2-74.9]

* P=<0.001



Ongekontamineerd Gekontamineerd

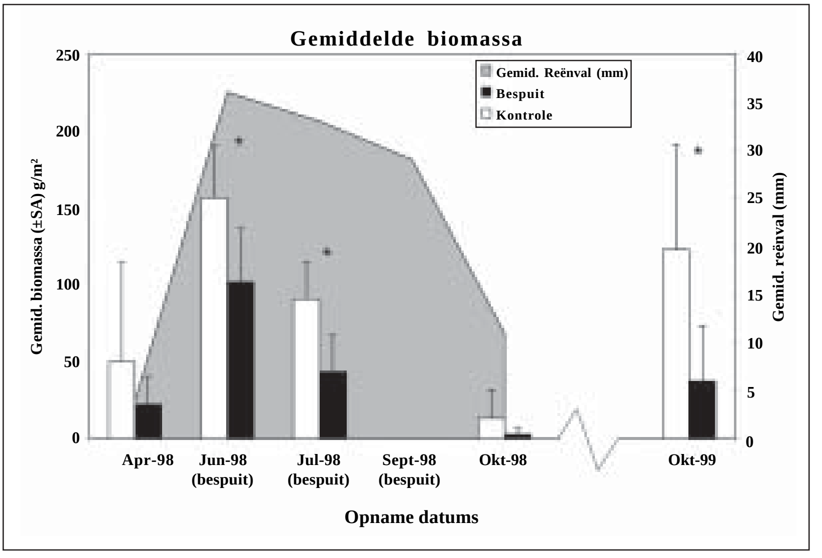
Figuur 1: *Sneë deur dieselfde streek van die hepatopankreasse van twee verskillende eksemplare van die houtluis* Porcellionides pruinosus. *Die snee links is verteenwoordigend van die houtluise (n = 20) uit 'n ongekontamineerde gebied waar die Zn-konsentrasie in die grond en strooisel gewissel het tussen 55 en 84 mg/kg en geen Cd gemeet is nie (n = 5). Die snee regs is verteenwoordigend (n = 20) van die gekontamineerde gebied waar die grond en strooisel 'n Cd-konsentrasie van tussen 2.0 en 8.3 mg/kg en 'n Zn-konsentrasie van tussen 947 en 1605 mg/kg (n = 5) gehad het (© JP Odendaal). Vergroting = X250.*

3.2 Lisosomale verandering in selomosiete as biomerker by die erdwurms *Aporrectodea caliginosa* en *Microchaetus* sp. onder veldtoestande

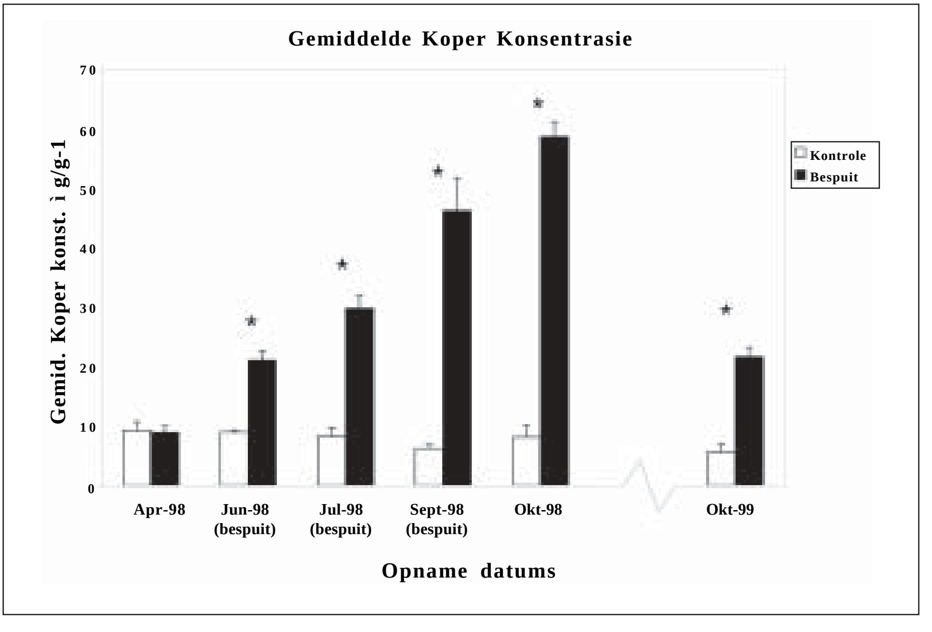
Die veranderinge in die NRR-tye van *Microchaetus* sp. op verskillende tydstippe nadat bespuiting van eksperimentele persele plaasgevind het, word in tabel 2 weergegee waaruit die betekenisvolle verlaging in die responstye duidelik blyk. Ook die biomassa (figuur 2) en getalledigtheid het betekenisvol afgeneem. Die digthede en biomassa van die wurms in die bespuite perseel was reeds enkele maande nadat die eerste bespuiting plaasgevind het, betekenisvol minder as dié in die kontroleperseel hoewel die reënval, wat normaalweg 'n belangrike rol speel om getalle te beïnvloed, in albei persele dieselfde was. Dit het ook gepaard gegaan met betekenisvolle verhogings in die grond se koperinhoud (figuur 3). Die NRR-tye het ook afgeneem by die bespuite wurms soos wat die koperinhoude gestyg het in beide die wurms en die grond. Die getalledigtheid en biomassa van die diere was, selfs een jaar nadat die bespuiting gestaak is, betekenisvol laer in die bespuite perseel ($p<0.05$) in vergelyking met die kontrole (figuur2).

TABEL 2: Die gemiddelde NRR-tye (minute) van eksemplare (N=6) van *Microchaetus* sp. wat op verskillende tye in die kontrole- en bespuite persele op Nieuwoudtville versamel is. (# = bespuit na versameling; * = betekenisvol verskillend van die kontrole, $p<0.05$).

	Gemiddelde NRR (min.)	
Versameldatum	**Kontroleperseel**	**Bespuite perseel**
April 1998#	60.6 ± 1.2	61.6± 0.6
Junie 1998 (bespuit)	60.0 ± 1.0	56.6 ± 2.2*
Julie 1998 (bespuit)	60.2 ± 1.8	57.0± 2.0*



Figuur 2: *Veranderinge in die biomassa van die inheemse erdwurm* Microchaetus sp. *in bespuite en kontrolepersele om die uitwerking van die swamdoder koperokschloried te illustreer. Soortgelyke verskille het in die getalledigthede van die twee persele voorgekom. * dui betekenisvolle verskille aan (p<0.05) (Aangepas vanaf Maboeta et al[24]).*



Figuur 3: *Veranderinge oor verskeie maande in die koperkonsentrasies in die grond van die bespuite en kontrolepersele waar die invloed van die swamdoder, koperoksichloried op die inheemse erdwurm* Microchaetus sp. *bestudeer is. * dui betekenisvolle verskille aan (p<0.05). (Uit: Maboeta et al[24]).*

Die veranderinge in die getalledigtheid en biomassa van *A. caliginosa* na opeenvolgende bespuitings het dieselfde basiese patroon vertoon.[24, 25] Daar was vir die eerste periode geen verskille tussen die kontrole- en bespuite persele nie. Ses maande na die laaste bespuiting het die situasie drasties verander en het die bespuite persele betekenisvol minder wurms as die kontroles opgelewer en was die gemiddelde biomassa ook laer in die bespuite persele. Dit het saamgeval met 'n gelykmatige verhoging in die liggaamsladings van koper in die wurms. Die lisosomale fragiliteitsanalise (soos weergegee deur die neutraalrooiretensietye) het egter getoon dat waar die tye voor die bespuiting in beide persele ongeveer identies was, dit direk na die eerste bespuiting reeds betekenisvol ($p<0.05$, $n = 6$) verskil het en dat die verskille eers ses maande na die laaste bespuiting opgehef is, maar dat die bevolkingsdigtheid, soos hierbo genoem, reeds geaffekteer was. Hierdie biomerker het dus reeds baie vroeg 'n aanduiding van stres by die wurms geopenbaar, maar die aanvanklike biomerkerrespons was omkeerbaar. Dit wil sê dat die verskil in NRR-tye tussen die bespuite wurms en kontrolewurms met tyd opgehef is. Hierdie stressituasie het desnieteenstaande ook ses maande later, na die laaste bespuiting, gelei tot 'n insinking in die bevolkingsdigtheid. Dit dui daarop dat die biomerker, ten spyte daarvan dat dit as algemene biomerker beskou word wat op verskeie vorme van stres kan reageer, wel in hierdie geval gekorreleer het met die koperinhoude van die wurms en die bevolkinginsinking duidelik voorafgegaan het. Hoewel *A. caliginosa* skynbaar minder gevoelig is as *Microchaetus* sp. omdat dit op bevolkingsvlak stadiger reageer het op die strestoestande en die getallevermindering eers heelwat later ingetree het, het dit tot dieselfde eindresultaat gelei, naamlik 'n insinking in die bevolkingsdigtheid. Beide hierdie ondersoeke is op verskillende plekke en onder verskillende veldtoestande uitgevoer. Omdat dit tot dieselfde basiese resultaat gelei het, ondersteun dit die vermoede dat die biomerkerrespons in beide gevalle voorspellingwaarde kan hê. Omvattender veldtoetse is steeds nodig om vas te stel of die omvang van die respons eweredig korreleer met die omvang van die belasting asook met die omvang van die bevolkingveranderinge. Die koperoksichloried het uiteindelik tog 'n negatiewe uitwerking op die bevolkings gehad en die biomerker het reeds op 'n vroeë stadium in die ondersoek toksiese stres uitgewys.

3.3 Lisosomale verandering in hemosiete by die tuinslak, *Helix aspersa*

Die koperkonsentrasie in die wingerdblare, slakke en grond vanaf die twee ondersoekpersele word in tabel 3 weergegee tesame met die neutraalrooiretensietye. Die konsentrasies was betekenisvol hoër in die monsters vanaf die bespuite wingerd by Delheim in vergelyking met die onbespuite kontrole by Helderberg. Dit was waar een week na bespuiting en het ook twee maande later gegeld toe die tweede opname onderneem is. Die neutraalrooiretensietye van die hemosiete van *Helix aspersa* en die koperkonsentrasies in die liggame van die slakke by die twee geleenthede toon duidelik dat die retensietye betekenisvol afgeneem het met die toename in koperkonsentrasie. Hoewel meer indringende ondersoeke nodig is met groter beheer oor veranderlikes, ondersteun hierdie resultate die laboratoriumbevindinge van verskeie outeurs[31, 32, 33, 34] wat bevind het dat die NRR 'n betroubare biomerker van blootstelling aan koper by erdwurms is. Snyman[29] het ook deur middel van laboratoriumondersoeke getoon dat die neutraalrooitegniek 'n baie betroubare aanduider is van blootstelling aan koper en ook besonder goed korreleer met koperkonsentrasies in die tuinslak. Daarbenewens het sy 'n duidelike verband tussen die respons en die voortplantingkoers van die tuinslak in laboratoriumondersoeke vasgestel. Die respons het dus as vroeë aanduider gedien van 'n verlaging in die voortplantingskoers wat uiteraard implikasies vir bevolkingsgroei inhou. Dieselfde effekte sou dus onder veldtoestande verwag kon word.

TABEL 3: Die gemiddelde koperkonsentrasies (ì g g^{-1}, droë massa) in grond, blare (strooisel) en slakke en die gemiddelde neutraalrooiretensietye (NRR) (minute) in ongekontamineerde en koperoksichloried bespuite lokaliteite.[29] Syfers tussen [hakies] dui omvang aan.

Lokaliteit	**Grond** (n=3)	**Blare** (n=3)	**Slakke** (n=10)	**NRRT** (n=10)
Helderberg (Ongekontamineerd) Kontrole	5.04 ±0.1 [4.9 – 5.2]	8.8 ±2.0 [6.7- 10.6]	47.0 ±14.4 [24.7- 79.2]	27.6 ±4.8 [20.0 – 36.0]
Delheim (Een week na bespuiting)	12.8 ±0.7 [12.0 – 13.3]	1247 ±342 [908 -1592]	100.2 ±33.6 [46.9-161.2]	22.8 ±4.3 [16.0 -32.0]
Delheim (Twee maande na bespuiting)	15.1 ±0.6 [14.5 – 15.7]	667 ±192.7 [534 – 888]	274.6 ±113 [161–429.6]	12.0 ±3.6 [8.0 – 16.0]

DIE GEBRUIK VAN BIOMERKERS VIR BIOMONITERING EN RISIKOBEPALING

Uit sowel die vroeëre laboratorium- as die daaropvolgende veldwaarnemings is dit duidelik dat verskeie biomerkers sensitief kan reageer op blootstelling aan kontaminante en dat dit as aanduiding kan dien van strestoestande wat verdere gevolge op bevolkingsvlak kan voorafgaan. Die vraag was dus of hierdie waarneembare response betroubare voorspellingwaarde het sodat dit met vertroue in biomonitering en ekotoksikologiese risiko-assesserings gebruik kan word.

Die bevindinge van hierdie studie dui daarop dat erdwurms in minstens twee afsonderlike ondersoeke NRR-biomerkerresponse getoon het wat as vroeë waarskuwings van komende nadelige effekte op bevolkingsvlak kon dien, hoewel die spesifisiteit daarvan vir die bepaalde stof nie uitgewys is nie. Die duidelike korrelasie tussen hierdie response by houtluise en slakke met die metaalinhoude in hulle liggame dui op ’n soortgelyke potensiaal by hierdie organismes. Dit sal verder ondersoek moet word of die waargenome korrelasies steeds oor ’n uitgebreide konsentrasiegradiënt geldig sal wees. Dit is denkbaar dat die gelyktydige insameling van eksperimentele biomerkerinligting vir ekologies relevante eindpunte, selfs in akute toetse[35] in die toekoms, hierdie gaping in ons kennis kan vul en dat ons mettertyd met ’n groter mate van sekerheid hierdie inligting in risiko-assesserings kan gebruik. Dit sal veral moontlik wees by enkelvoudige stres, want waar gekompliseerde, meervoudige strestoestande aanwesig is, moet onderskeid gemaak kan word tussen die effekte van die verskillende stresfaktore. Dit sal veral moontlik wees waar gekompliseerde, meervoudige strestoestande ontbreek.

Risiko-assessering van kontaminante (figuur 4) is in die eerste plek gemik op assessering van blootstelling[36] waarby die skatting van voorspelde omgewingskonsentrasie (VOK) van ’n vrygestelde verbinding in die omgewing ingesluit is. Dit word gebaseer op inligting oor die produksie, prosessering, wegdoening en gebruik daarvan. Tweedens, gaan dit oor die assessering van effekte, gebaseer op gegewens vanaf akute en chroniese toksisiteitstoetse waaruit, deur ekstrapolasie, konsentrasies verkry word waarby geen nadelige effekte voorkom nie (voorspelde geen-effek konsentrasies of VGEK). Derdens volg risikokarakterisering deur die VOK met die VGEK te vergelyk deur middel van die sogenaamde kwosiëntmetode. Indien die VOK groter is as die VGEK word gepoog om blootstelling-/effekgegewens te hersien en te verfyn sodat die risiko nog meer akkuraat bepaal kan word. Indien die VOK steeds groter is as die VGEK, word maatreëls oorweeg om die risiko wat so geïdentifiseer is, te probeer verminder.

Indien daar verskuiwings in lewensloopresponse[37] voorkom in reaksie op strestoestande, sal die inagneming en gebruik daarvan nodig wees om ’n meer ekologies relevante antwoord te verkry.

Biomerkerresponse kan ’n meer praktiese, vroeë waarskuwing bied van potensiële gevaar en mag ook makliker toepasbaar wees vir regulatoriese doeleindes. In hierdie geval het biomerkers (wat hier gebruik word in die strenger definisie van Van Gestel en Van Brummelen[1]) in die laaste jare toenemend veld gewen[38,39,17] as prakties uitvoerbare en betroubare verskaffers van meganistiese skakels tussen effekte op die molekulêre, mikrostrukturele, biochemiese en fisiologiese vlakke. Daarmee word bedoel dat die herhaalbaarheid goed is en die statistiese betroubaarheid van die verband tussen die gemete biomerkerrespons en die konsentrasie hoog is. Dit is egter die skakels met hoër bevolkings- en ekostelselvlakke wat nog kortkom.

Vanuit die perspektief van risiko-assessering kan geredeneer word dat biomerkers van effek moontlik van meer waarde is as biomerkers van blootstelling omdat biomerkers van effek kousaal verbind kan word met ’n duidelike eindpunt. Biomerkers van blootstelling bestaan gewoonlik uit vroeë of eersteplek-response wat aandui dat blootstelling wel plaasgevind het maar wat nog nie met spesifieke toksiese effekte (skade) of absolute konsentrasievlakke van ’n meer permanente aard in verband gebring kan word nie.

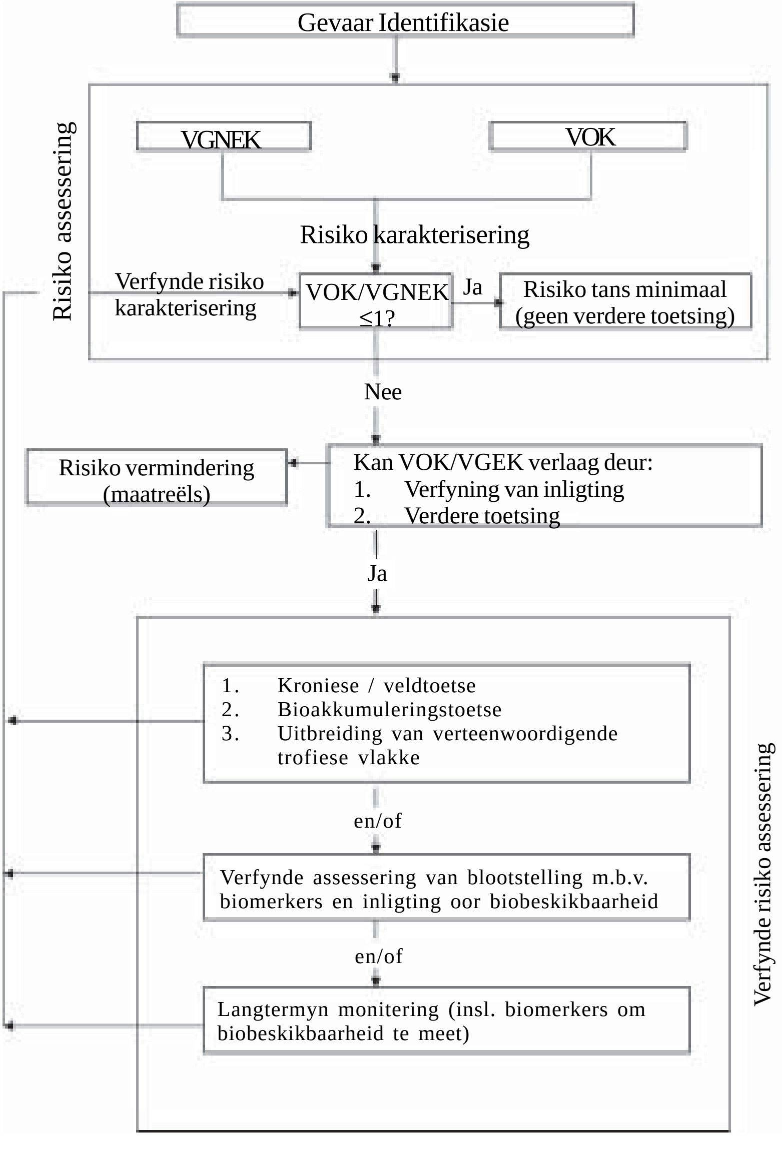
Op subsellulêre vlak is vooruitgang reeds gemaak deurdat die resultate van bogenoemde studies en dié van verskeie ander outeurs aangetoon het dat sekere biomerkerresponse, soos die bepaling van die neutraalrooiretensietyd in erdwurms[39, 31, 32, 4,, 24, 25] en slakke[29] of sellulêre energietoedeling[40] by varswatergastropode met redelike betroubaarheid gebruik kan word om verbande aan te toon. Veranderinge in die deurlatendheid van lisosoommembrane wat deur veral metale veroorsaak word, is met ekologies relevante lewensloopkenmerke in verband gebring. Hoewel dit nie ’n definitiewe, meganistiese koppeling met strukturele en funksionele eienskappe van die groter ekostelsel as sodanig is nie, het hierdie outeurs tog aangetoon dat dosis-verwante response in terme van biomassa-veranderinge en voortplanting kan korreleer met veranderinge in neutraalrooiretensietye.

Hierdie neutraalrooitegniek is gevolglik goed gevestig om sellulêre toksisiteit akkuraat te meet en is daarby sensitief en maklik om te gebruik, hoewel dit nie ’n hoogs spesifieke biomerker is nie. Dit is nou reeds vir ’n aantal metale en organiese stowwe gebruik op ’n reeks erdwurmspesies[41, 42] soos *Lumbricus terrestris, L. rubellus, L. custaneas, Aporrectodea rosea, A. caliginosa, Eisenia fetida, E. andrei* en ’n *Microchaetus* sp. en ’n landslak[43] soos *Helix aspersa.* In alle gevalle is statisties betroubare dosis-responsverhoudings deur verskillende navorsers verkry. Dit beklemtoon die betroubaarheid van die tegniek ten spyte daarvan dat dit swaar steun op subjektiewe waarneming.[4]

Die gebruik van ander tipes biomerkers soos stresproteïne, metallotioniene, ultrastrukturele veranderinge en isosieme het ook reeds veld gewen as potensiële werktuie om gevaarlike toestande te identifiseer en vir assessering van blootstelling.[17] So is die komeet-evaluering, wat genotoksisiteit[43] aantoon, ook reeds met vrug op grondorganismes toegepas. Die bruikbaarheid van hierdie biomerkers sal duideliker word sodra ’n groot genoeg databasis vir verskillende spesies, gronde en kontaminante algemeen beskikbaar is. Sommige mag nie prakties wees vir algemene gebruik in veldmonitering nie,[21] hoofsaaklik omdat histologiese tegnieke vereis word wat arbeidsintensief en tydrowend is, maar andere soos die neutraalrooiretensietegniek en die komeettegniek[44] kan gestandaardiseer word en teen lae koste deur ’n opgeleide tegnikus gebruik word op organismes wat in die veld versamel is om ’n snelle aanduiding te gee van toksiese stres. Die blootstelling van ongekontamineerde organismes met ’n bekende biomerkerrespons aan gekontamineerde toestande kan ook ’n praktiese en realistiese werktuig verskaf om biobeskikbaarheid te meet. Minstens kan dit in ’n groter mate as wat tans in die vakliteratuur erken word, help om die probleme te omseil wat die assessering van biobeskikbaarheid inhou.[39] Dit kan gedoen word deur die organismes direk in die veld te plaas in houers[45] of mikrokosmosse, of deur hulle aan veldgrond in die laboratorium bloot te stel en die daaropvolgende verandering in

biomerkerresponse te moniteer.[46] Omdat dit onder veldtoestande uitgevoer word, mag dit in die toekoms 'n meer ideale biomoniteringsmetode verskaf vir die evaluering of skatting van die biobeskikbaarheid en uiteindelik moontlik ook die voorspelling van bevolkingsveranderinge as gevolg van voortdurende toksiese stres.

Selfs al is biomerkerresponse nie substans-spesifiek vir 'n enkele toksiese agens nie maar



Figuur 4: *Die konvensionele skema waarvolgens risiko-assessering van grond plaasvind deur die voorspelde omgewingskonsentrasie (VOK) (blootstelling) met die voorspelde geen-effek konsentrasie (VGEK) te vergelyk; aangepas om die voorgestelde wyse waarop biomerkers in die proses geïnkorporeer kan word, aan te dui.*

eerder vir ’n bepaalde chemiese groep, het hulle skanderingswaarde en kan, indien geëvalueer teenoor voldoende kontroles of referensielokaliteite, dien as vroeë aanduiders van eerstevlak, sellulêre of biochemiese wisselwerking met die toksiese stof. Hoewel die beskikbaarheid van identiese kontrole- of referensielokaliteite problematies is, is die teenoorgestelde waar vir gronde wat tydens landboubespuitingspraktyke selektief chemies gekontamineer word. Gevolglik mag biomerkers in die toekoms ook ’n belangrike rol speel in die bestuur van landbou-bespuitingsprogramme bykomend tot hulle moontlike rol in regulatoriese risiko-assessering ter beskerming van die mens en die natuur. Bespuiting met plaagmiddels veroorsaak tydelike veranderinge in chemiese blootstelling. Die blootstelling in landbougrond kan van korte duur wees weens die kort halfleeftyd van moderne landboumiddels sowel as gevolg van verskynsels soos sproeidryf en afloop[46] wat spuitstowwe na aangrensende gebiede voer. Dit kan aansienlik verskil van die langtermynblootstelling wat in industrieel gekontamineerde gronde voorkom. In die landbou word vroeë waarskuwing van toksiese stres vereis voordat bestuursbesluite oor bespuitingsprogramme se duur en frekwensie geneem kan word. Besluite oor die frekwensie van bespuiting en die konsentrasievlakke daarvan word selde geneem op grond van inligting oor die biobeskikbaarheid van die verbinding wat oorbly na die eerste of daaropvolgende bespuitingsessie, nóg in terme van die stof se biobeskikbaarheid vir die teikenorganismes, nóg in terme van sy biobeskikbaarheid vir ander, nieteikengroepe. Besluite word meer dikwels gebaseer op inligting wat deur chemiese verskaffers geprojekteer word oor die verwagte residuvlakke, en hierdie inligting word dikwels verkry onder totaal verskillende omgewingstoestande in ’n ander land waar die stof vervaardig word. In baie gevalle word chemiese analises van grondmonsters ten duurste onderneem, maar dit verskaf geen inligting oor biobeskikbaarheid nie en lei dus tot oor- of onderbeskerming. As voorbeeld kan die oorskatting van risiko as gevolg van die effekte van veroudering op die biobeskikbaarheid van chemiese stowwe genoem word.[48] Vanselfsprekend kan dit lei tot onderbeskerming met gepaardgaande ernstige ekonomiese implikasies soos oesverliese weens plaaguitbrake enersyds of onnodige uitgawes andersyds aan duur plaagbeheermiddels en die gepaardgaande risiko van omgewingsbesoedeling.

Biomerkerreponse verskaf ’n vroeë aanduiding dat opname en interne blootstelling plaasgevind het en dat ’n toksiese reaksie mag plaasvind. Waar ’n invertebraat byvoorbeeld blootgestel word en die NRR-tye gemeet word, as biomerker van blootstelling, is daar nie noodwendig ’n verband met die sellulêre toksisiteit van die stof nie. Slegs nadat die verandering in die membraan-deurlatendheid gepaardgaan met werklike toksiese effekte kan NRR gesien word as ’n biomerker van toksiese effek. Wanneer dit bereik word, kan die blootstelling-responsverhouding (onder eksperimentele toestande en met ’n dosisreeks) tussen toksikant en effek, en tussen omgewingstoksikant en NRR direk met mekaar in verband gebring word. Selfs onder goed gekontroleerde eksperimentele toestande is daar geen absolute sekerheid nie en aannames moet steeds, soos onder veldtoestande, gemaak word oor die biobeskikbaarheid van die toetsstof. Hierdie aannames kan met konkrete gegewens vervang word, maar meer ondersoeke moet ontwerp en uitgevoer word om dit te versamel. As hierdie dosis-respons verhoudings eers bekend is, sal bykomende studies met die toksikant in die omgewingsubstraat nuttig wees om biobeskikbaarheid beter te verstaan. Vergelyking van NRR tussen eksperimentele en veldtoestande, soos hier vir erdwurms en slakke gerapporteer, kan gebruik word om ’n kwantitatiewe maatstaf van biobeskikbaarheid te ontwikkel. Sonder hierdie gegewens is NRR as biomerker van blootstelling slegs van kwalitatiewe waarde. Om hierdie bevindinge te kan gebruik vir die stel van aanvaarbare omgewingsvrystellingswaardes, sal steeds ’n “wetenskaplike waarde-oordeel” vereis.

Uit ’n toksikologiese oogpunt het biomerkers in vergelyking met chemiese metings die opvallende voordeel dat dit ’n aanduiding bied van ’n reaksie wat reeds begin het en nie ’n blote

konsentrasie weergee nie. Dit maak die biomerker meer relevant vir die assessering van toksisiteit. Dit is veral waar vir biochemiese response[48] maar ook vir sellulêre response soos veranderinge in die stabiliteit van die lisososoommembraan. Dit reflekteer byvoorbeeld die omvang van sitologiese skade in verskillende grade op ’n dosisverwante manier. Hierdie respons mag varieer tussen verskillende spesies en sal na verwagting verskille in die relatiewe gevoeligheid van lewens-loopeienskappe weerspieël.[41] Dit is egter ’n dosisverwante respons en verskaf gevolglik ’n meer betroubare maatstaf van die biobeskikbare fraksie van die toksiese stof wat oor tyd opgeneem is uit die substraat en wat die effek veroorsaak. Hoewel die niespesifisiteit dikwels as ’n nadeel gesien word om oorsaak en gevolg met mekaar in verband te bring, kan die respons steeds bruikbaar wees juis omdat dit die agtergrondkonsentrasie en ander stresfaktore integreer met die effek van die biobeskikbare fraksie van die kontaminant in dieselfde respons. Aangesien dit ’n vroeë respons is, mag dit, ten minste vir sekere stowwe, ook die uitwerking van tyd en duur van kontaminasie op biobeskikbaarheid weerspieël, hoewel dit onder veldtoestande nouliks bepaal kan word. Dit mag die moontlikheid bied om vas te stel of ekwilibrium in die matriks van die substraat bereik is al dan nie. Dit mag ook (onder identiese toestande van pH, grondtekstuur ensovoorts) die verskil in biobeskikbaarheid van ’n verbinding uitwys wat tot ’n substraat toegevoeg is in vergelyking met ’n gekontamineerde veldmonster wat presies dieselfde konsentrasie bevat maar ’n lang blootstellingsgeskiedenis het.

Aangesien die biobeskikbaarheid van ’n stof in ’n bepaalde bodem baie dinamies en veranderlik kan wees (byvoorbeeld weens fluktuasie in omgewingstoestande soos pH, temperatuur, vog ensovoorts), kan eenvoudige biomerkersresponse die ideale metode bied vir gereelde assessering van veranderings, op voorwaarde dat die sensitiwiteit van die respons in stand gehou word en praktiese uitvoerbaarheid moontlik is. Gekontamineerde gronde bevat gewoonlik mengsels van toksikante[49] sodat meervoudige blootstelling plaasvind wat buitendien die vasstelling van ’n kousale verband tussen ’n respons en ’n spesifieke toksikant in die mengsel baie moeilik maak, indien nie onmoontlik nie. Die niespesifisiteit van sommige biomerkers wat algemeen beskou word as ’n nadeel in ekologiese risikobepaling, mag gevolglik nog steeds bruikbaar wees. Hoewel die relatiewe bydrae van die verskillende faktore tot die stresrespons nie afsonderlik identifiseerbaar is nie, mag dit ons nog steeds van ’n praktiese, realistiese en bruikbare hulpmiddel voorsien. Daarmee kan die stres wat veroorsaak word deur ’n chemiese stof in samehang met die kompliserende faktore onder veldtoestande, steeds geassesseer word. Die resultate wat met behulp van erdwurms en slakke behaal is, dui daarop.

Omdat die biomerker gebaseer word op ’n sogenaamde laer-vlak sellulêre of biochemiese respons, skep dit die moontlikheid om die “eenheid-van-lewe” benadering te volg wanneer die gevoelighede van verskillende spesies vergelyk word. Daarmee word bedoel dat ons in staat is om sekere veralgemenings in verband met biologiese organisasie en funksie te maak op molekulêre en sellulêre vlak wat nie meer moontlik is soos wat ons met die organisatoriese hiërargie op beweeg nie, weens die toenemende biologiese kompleksiteit en ekologiese wisselwerkings.[53] Deur uiteindelik response wat as gemene delers tussen spesies beskou kan word, te identifiseer en kwantitatief met mekaar in verband te bring, mag ekstrapolasies meer sinvol wees. Die rede daarvoor is dat die ekstrapolasies tussen meer simplistiese of vergelykbare entiteite (selle, subsellulêre strukture of molekules of soortgelyke prosesse) plaasvind. Dit kan moontlik nie gelyk gestel word aan ’n direkte vergelyking tussen die totale dier se response op ’n toksikant nie, wat heelwat verskillend mag wees, maar sal nogtans inligting verskaf oor relatiewe blootstelling van die verskillende spesies. Die belangrikheid daarvan is geleë in die feit dat biobeskikbaarheid van stowwe spesie-afhanklik is. Biomerkers kan bydra tot ’n meer generiese benadering tot die bepaling van blootstelling in gronde sodra meer basiese gegewens vir verskillende spesies beskikbaar is.

Verskeie navorsers[17, 41, 50,51] is reeds daarvan oortuig dat biomerkers toenemend as akkurate, kwantitatiewe bepalers van blootstelling in verskeie omgewings naas grond kan dien. Die besonder komplekse aard van die grondomgewing veroorsaak egter dat eenvoudige, praktiese aanwending daarvan in risiko-assesseringprosedures nog ontwikkel moet word. Figuur 4 toon die moontlike toekomstige aanwending van biomerkers om die verdere verfyning te bewerkstellig. Natuurlik wil regulatoriese owerhede risiko-assesseringprosedures baie eenvoudig en hanteerbaar hou. Die totale ignorering van die biologiese aard van sommige veranderlikes,[2] wat wel met behulp van biomerkers meetbaar is, sal die wetenskaplike basis van die prosedure steeds beperk. Gevolglik is daar duidelike uitdagings vir navorsings- en regulatoriese instansies om hierdie moontlikhede as gemeenskaplike eerder as opponerende doelwitte verder te ontwikkel.

Toksisiteitstoetse word voortdurend wêreldwyd uitgevoer. Vir hierdie doel moet ’n verskeidenheid gevoelige organismes steeds gebruik word. Die voortdurende monitering van hierdie toetsorganismes se gevoeligheidsvlakke is dus baie belangrik. Dit bied ’n ander terrein waar biomerkers van nut kan wees. Biomerkers sou veranderinge in gevoelighede vroegtydig kon aandui sodat dit in toetse en latere risiko-assesserings in ag geneem kan word. Genetiese erosie[52] wat kan volg op langdurige blootstelling van organismes, kan tot foutiewe bevindinge in toksisiteitstoetse lei. Met die jongste vooruitgang wat op die gebied van molekulêre tegnieke gemaak is, bied verdere ondersoek na molekulêre biomerkers en ’n groter verskeidenheid van veranderlikes[56] eweneens ’n vrugbare en uitdagende terrein vir verdere navorsing in die breë ekologiese veld en in die besonder op die gebied van stresekologie. Die Ekogenomikaprogram[54] in Nederland is reeds ’n belangrike, leidingnemende stap in hierdie rigting.

GEVOLGTREKKINGS

Die inkorporering van verskillende biomerkers van sowel blootstelling as effek in bestaande modelle en assesseringskemas, kan verskeie voordele inhou. Enersyds kan dit help om te bepaal of blootstelling inderdaad plaasgevind het of sou kon plaasvind. Andersyds dat die betrokke kontaminant wel genoegsaam biobeskikbaar was om tot effekte te lei.

Hierdie reeks eksperimentele ondersoeke en die gepaargaande oorsig van die vakliteratuur het getoon dat biomerkerresponse by houtluise, erdwurms en landslakke nuttige inligting kan verskaf wat mag dui op toekomstige veranderinge op hoër organisatoriese vlakke. Hierdie tegnologie is nog nie ingevoer en geïntegreer met die huidige risiko-assesseringsmetodologie van gronde nie en bied dus uitdagings vir navorsers en reguleerders om gemeenskaplike oplossings te vind.

Reguleerders worstel met die praktiese toepassing van die beskikbare kundigheid om die bekerming van verskillende spesies onder ’n verskeidenheid van variërende toestande in verskillende omgewings te verseker. Voordat die spesifisiteit van ’n battery van biomerkers nie uitgeklaar is vir verskeie spesies en meer duidelike en oorsaaklike verbande van biomerkerresponse met verandering op bevolkings- en gemeenskapsvlak gelê is nie, kan algemene aanwending nie sonder meer plaasvind nie. Hoewel sommige biomerkers nie maklik prakties aangewend kan word nie weens die gekompliseerde aard daarvan, kan sommige teen lae koste en met relatief min opleiding suksesvol in die veld toegepas word. Dit kan ’n snelle metode bied om toksiese stres aan te dui. Die eksperimentele blootstelling van ongekontamineerde organismes met ’n bekende biomerkerrespons in mikrokosmosse direk in die veld[19] of in grond wat in die veld versamel is en die daaropvolgende monitering van biomerkerresponse, kan ’n waardevolle aanvuller of plaasvervanger vir chemiese analises word, veral omdat dit meer ekotoksikologies relevante gegewens kan oplewer.

Die slotsom is dat biomerkerresponse met die nodige kontroles in plek, in die toekoms kan help om as praktiese, diagnostiese hulpmiddels die assessering van blootstelling in risiko-analiseskemas

te verbeter. Hulle kan in samehang en aanvullend tot toksisiteitstoetse gebruik word. Hoewel dit belangrik is om biomerkerresponse kousaal te kan verbind met ekologies belangrike eindpunte, is dit nie ’n voorvereiste vir die bestudering van biomerkers as potensieel nuttige gereedskap, ook vir die bepaling van biobeskikbaarheid nie. Hulle mag nog nie ’n aanvaarde rol hê in die voorspelling van ekologiese uitkomste nie, maar kan ’n diagnostiese rol in die bepaling van blootstelling speel en dus meer volledig benut word in risiko-assessering. Die nodige riglyne vir hulle gebruik in hierdie verband moet dus deur samewerking tussen navorsers, beleidsformuleerders en -toepassers ontwikkel word.

DANKBETUIGINGS

Finansiële ondersteuning van die Universiteit van Stellenbosch, die Volkwagen Stigtung (Duitsland) en die Nasionale Navorsingstigting binne die program “Bewaring en bestuur van ekostelsels en biodiversiteit” word met dank erken. Ons bedank ook graag proff. O. Larink (Universiteit van Braunschweig, Duitsland) en H. Eijsackers (Universiteit van Wageningen, Nederland) vir kritiese maar konstruktiewe kommentaar.

BIBLIOGRAFIE

1 Van Gestel, C.A.M., Van Brummelen, T.C. (1996). Incorporation of the biomarker concept in ecotoxicology calls for a redefinition in terms. *Ecotoxicology,* 5, 217-225.

2 Reinecke, A.J., Reinecke, S.A. (2006). Die konsep van biobeskikbaarheid en die neerlê van eenvormige standaarde vir toelaatbare chemiese kontaminasie in die grond. *S.A. Tydskrif vir Natuurwetenskap en Tegnologie,* 25(3), 149-163.

3 Lanno, R., Wells, J., Conder, J., Bradham, K., Basta, N. (2004). The bioavailability of chemicals in soil for earthworms. *Ecotox. Environ. Saf.*, 57, 9-47.

4 Reinecke, S.A., Reinecke, A.J. (1999) Lysosomal response of earthworm coelomocytes induced by long-term experimental exposure to heavy metals. *Pedobiologia*, 43, 585-593.

5 Endo, T., Haraguchi**,** K., Cipriano, F., Simmonds, M. P., Hotta, Y. and Sakata M. (2004)**.** Contamination by mercury and cadmium in the cetacean products from Japanese market. *Chemosphere*, 5*4,1653-1662*.

6 Lowe, D.M. , Fossato, V.U., Depledge, M.H. (1995). Contaminant-induced lysosomal membrane damage in blood cells of mussels *Mytilus galloprovincialis* from the Venice Lagoon: an in vitro study. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 129, 189-196.

7 Spurgeon, D.J., Hopkin, S.P. (1996). Effects of variations of the organic matter content and pH of soils on the availability and toxicity of zinc to the earthworm *Eisenia fetida. Pedobiologia,* 40, 80-96.

8 Reinecke, A.J., Reinecke, S.A. (2003). Die beskerming van biologiese diversiteit deur gebruik te maak van die gevoeligheidsvariasie van spesies vir toksiese stowwe. *S.A. Tydskrif vir Natuurwetenskap en Tegnologie,* 22, 94-102.

9 Suter II G.W., Barnthouse, L.W., Breck, J.E., Gardner, R.H., O’Neill, R.V. (1985). Extrapolating from the laboratory to the field: How uncertain are you? In Cardwell RD, Purdy R, Bahner RC (reds.) *Aquatic Toxicology and Hazard Assessment.* Amer Soc for Testing and Materials, Philadelphia, pp. 400-413.

10 Slooff W., Van Oers, J.A.M., De Zwart, D. (1986). Margins of uncertainty in ecotoxicological hazard assessment. *Environ. Toxicol. Chem.,* 5, 841-852.

11 Kooijman, S.A.L.M. (1987). A safety factor for LC50 values allowing for differences in sensitivities among species. *Water Res.,* 21, 269-276.

12 Van Straalen, N.M., Denneman, C.A. (1989). Ecotoxicological evaluation of soil quality criteria. *Ecotox. Environ. Saf.*, 18, 241-251.

13 Posthuma, L., Suter II,G.W. (reds.) (2001). The use of species sensitivity distributions in ecotoxicology, (CRC Press, Boca Raton, VSA).

14 Van Straalen, N.M., Løkke, H. (1997) Ecological approaches to soil ecotoxicology. In Van Straalen, N,M,, Løkke, H, (eds.) *Ecotoxicological risk assessment of contaminants in soil.* (Chapman & Hall, London, pp3-21).

15 Eijsackers, H. (1997). Soil ecotoxicology: still new ways to explore or just paving the road? In Van Straalen, N.M., Løkke, H, (eds.) *Ecotoxicological risk assessment in soils*. (Chapman & Hall, London, pp 323-330).
16 Weeks, J.M. (1997). Effects of pollutants on soil invertebrates: links between levels. In: Schuurmann G, Markert B (eds) Ecotoxicology. Ecological fundamentals, chemical exposure, and biological effects. (John Wiley, New York, pp 645-662).
17 Kammenga, J.E., Dallinger, R., Donker, M.H., Kohler, H.R., Simonsen, V., Triebskorn, R., Weeks, J.M. (2000). Biomarkers in terrestrial invertebrates for ecotoxicological soil risk assessment. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.*, 164, 93-147.
18 Reinecke, A.J., Reinecke, S.A. (2004). Earthworms as test organisms in ecotoxicological assessment of the impact of toxicants on ecosystems. In C.A. Edwards (ed.) *Earthworm Ecology* (CRC Press, Boca Raton, VSA, pp. 299-320).
19 Reinecke, S.A., Reinecke, A.J. (2007a). The impact of organophosphate pesticides on earthworms in orchards in the Western Cape, South Africa. *Ecotox. Environ. Saf.*, 66, 244-251.
20 Odendaal, J.P., Reinecke, A.J. (2004). Bioaccumumulation of cadmium and zinc, and field validation of a histological biomarker in terrestrial isopods. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 72, 769-776.
21 Odendaal, J.P., Reinecke, A.J. (2003). Quantifying Histopathological Alterations in the Hepatopancreas of the Woodlouse *Porcellio laevis* (Isopoda) as a Biomarker of Cadmium Exposure. *Ecotox. Environ. Saf.*, 56, 319-325.
22 Odendaal, J.P., Reinecke, A.J. (1999). The sublethal effects and accumulation of cadmium in the terrestrial isopod *Porcellio laevis* Latr. (Crustacea, Isopoda). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 36, 64-69.
23 Kula, H. (1992). Measuring the effects of pesticides on earthworms in the field – test design and sampling methods. In Greig-Smith, P.W., Becker, H. Edwards, P.J., Heimbach, F. (reds.), *Ecotoxicology of earthworms.* (Intercept, UK, pp. 90-99).
24 Maboeta, M.S., Reinecke, A.J., Reinecke, S.A. (2002). The relation between lysosomal biomarker and population responses in a field population of *Microchaetus* sp (Oligochaeta) exposed to the fungicide copper oxychloride. *Ecotox. Environ. Saf.*, 52, 280-287.
25 Maboeta, M.S., Reinecke, S.A., Reinecke, A.J. (2003). Linking lysosomal biomarker and population responses in a field population of *Aporrectodea caliginosa (*Oligocheata) exposed to the fungicide copper oxychloride. *Ecotox. Environ. Saf.*, 56, 411-418.
26 Katz, S.A., Jennis, S.W. (1983). Regulatory compliance monitoring by atomic absorption spectrometry. (Verlag Chemie International, Fl, VSA).
27 Scott-Fordsman, J.J., Weeks, J. M. (1998). Review of selected biomarkers in earthworms. In Sheppard, S., Bembridge, J.M., Hompstrup, M., Posthuma, L. (eds.) *Advances in earthworm ecotoxicology*. (SETAC Press, Pensacola, Fl, pp. 173-189).
28 Reinecke, S.A., Helling , B., Reinecke, A.J. (2002). Lysosomal response of earthworm (*Eisenia fetida)* coelomocytes to the fungicide copper oxychloride and relation to ecologically relevant endpoints. *Environ. Toxicol. Chem.*, 21, 1026–1031.
29 Snyman, R.G. (2001). Cellular biomarkers of exposure to the fungicide copper oxychloride in the common garden snail *Helix aspersa* in Western Cape vineyards. PhD-tesis, Universiteit van Stellenbosch, Suid-Afrika. 154p.
30 Odendaal, J.P. (2002). Histological change in the hepatopancreas of terrestrial isopods as potential biomarker of cadmium and zinc exposure. PhD-tesis, Universiteit van Stellenbosch, Suid-Afrika. 138p.
31 Svendsen, C., Weeks, J.M. (1997). Relevance and applicability of a simple biomarker of copper exposure. Links to ecological effects in a laboratory study with *Eisenia andrei*. *Ecotox. Environ. Saf.*, 36, 72-79.
32 Nicholson, S. (1999). Cardiac and lysosomal responses to periodic copper in the mussel *Perna viridis* (Bivalvia: Mytilidae). *Mar. Pollut. Bull.*, 38, 1157-1162.
33 Helling, B., Reinecke, S.A., Reinecke, A.J. (2000). Effects of the fungicide copper oxychloride on the growth and reproduction of *Eisenia fetida* (Oligochaeta). *Ecotox. Environ. Saf.*, 46,108-116.
34 Scott-Fordsman, J.J., Weeks, J.M., Hopkin, S.P. (2000). Importance of contamination history for understanding toxicity of copper to earthworms *Eisenia fetida* (Oligochaeta, Annelida) using neutral red retention assay.*Environ. Toxicol. Chem.*, 19, 1774-1780.
35 Maboeta, M.S., Reinecke, S.A., Reinecke, A.J. (2004). The relation between biomarker and organismal responses in an acute toxicity test with *Eisenia fetida* (Oligochaeta) exposed to the fungicide copper oxychloride. *Environ. Res.*, 96, 95-101.

36 Ahlers, J., Diderich, R. (1998). Legislative perspective in ecological risk assessment. In Schuurmann, G., Markert, B. (eds.) *Ecotoxicology*. (John Wiley, New York, pp 841-868).

37 Kammenga, J.E., Van Gestel, C.A.M., Hornung, E. (2001). Switching of life-history sensitivities to stress in soil invertebrates. *Ecol Applicat.*, 11, 226-238.

38 Peakall, D.B. (1992). *Animal biomarkers as pollution indicators.* (Chapman & Hall, London).

39 Weeks, J.M. (1995) The value of biomarkers for ecological risk assessment: academic toys or legislative tools? *Appl. Soil. Ecol.*, 2, 215-216.

40 Moolman, L., Van Vuren, J.H.J., and Wepener, V. (2007) Comparative studies on the uptake and effects of cadmium and zinc on the cellular energy allocation of two freshwater gastropods. *Ecotox. Environ. Saf.* (In press)

41 Spurgeon, D.J., Svendsen, C., Rimmer, V.R., Hopkin, S.P., Weeks, J.M. (2000). Relative sensitivity of life-cycle and biomarker responses in four earthworm species exposed to zinc. *Environ. Toxicol. Chem.*, 19, 1800-1808.

42 Reinecke, S.A., Helling, B., Reinecke, A.J. (2002). Lysosomal response of earthworm (*Eisenia fetida*) coelomocytes to the fungicide copper oxychloride and relation to life-cycle parameters. *Environ. Toxicol. Chem.*, 21:1026-1031.

43 Snyman, R.G., Reinecke, S.A., Reinecke, A.J. (2000). Hemocytic lysosome response in the snail, *Helix aspersa*, after exposure to the fungicide copper oxychloride. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 39, 480-485.

44 Reinecke, S.A, Reinecke, A.J. (2004). The comet assay as biomarker of heavy metal genotoxicity in earthworms. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 46, 208-215.

45 Reinecke, S.A., Reinecke, A.J. (2007b). Using biomarkers to study effects of chlorpyrifos on the earthworm *Aporrectodea caliginosa* in microcosms. *Ecotox. Environ. Saf., 66, 92-101.*

46 Schulz, R. (2001). Comparison of spraydrift- and runoff-related input of azynphos-methyl and endosulfan from fruit orchards into the Lourens River, South Africa. *Chemosphere*, 45, 429-437.

47 Alexander, M. (2000). Aging, bioavailability, and overestimation of risk from environmental pollutants. *Environ. Sci. Technol.*, 34, 4259-4265.

48 Stürzenbaum, S.R., Kille, P., Morgan, A.J. (1998). Identification of heavy metal induced changes in the expression patterns of the translationally controlled tumour protein (TCTP) in the earthworm *Lumbricus rubellus. Biochem. Biophys. Acta.*, 1398, 294-304.

49 Weltje, L. (1998). Mixture toxicity and tissue interactions of Cd, Cu, Pb and Zn in earthworms (Oligochaeta) in laboratory and field soils: a critical evaluation of data. *Chemosphere*, 36, 2643-2660.

50 Reinecke, A.J., Van Gestel, C.A.M., Reinecke, S.A. (2004). Using biomarkers in soil organisms for assessing bioavailablity and toxicity of environmental toxicants. In: Shakir Hanna, S.H., Mikhail, W.Z. (reds), *Soil Animals and Sustainable Development.* (Inst. of African Research and Studies, Cairo University, Egypt. pp. 427-448).

51 Wepener, V., van Vuren, J.H.J., Chatiza F.P., Mbizi, Z., Slabbert, L., Masola, B. (2005) Active biomonitoring in freshwater environments: early warning signals from biomarkers in assessing biological effects of diffuse sources of pollutants. *Physics and Chemistry of the Earth, Parts A/B/C, Volume 30, (11-16), 751-761.*

52 Van Straalen, N.M. (1999). Genetic biodiversity in toxicant-stressed populations. *Progr. Environ. Sc.*, 12, 195-201.

53 Moore, M.N., Depledge, M.H., Readman, J.W., Leonard, D.R.P. (2004) An integrated biomarker-based strategy for ecotoxicological evaluation of risk in environmental management. *Mutation Research*, 552, 247-268.

54 Ecogenomics Programme: http://www.ecogenomics.nl/

55 Moolman, H., Lambrechts, J. (1996) Physical land use resources affecting the long term environmental sustainability of agriculture in the Western Cape. In M. Lipton, M. de Klerk, & M. Lipton, *Land, labour and livelihoods in rural South Africa, vol.1* (pp. 117–158). Durban: Indicator Press.

56 Van Straalen, N.M. (2003) Ecotoxicology becomes stress ecology. Enviroenmental Science and Technology, September, 325-330.

View publication stats