

## ВЛИЯНИЕ КАДМИЯ НА ДОЖДЕВЫХ ЧЕРВЕЙ, НАСЕЛЯЮЩИХ ФОНОВЫЕ И ТЕХНОГЕННО ЗАГРЯЗНЁННЫЕ УЧАСТКИ

А. В. Рыбак<sup>1</sup>, Т. А. Майстренко<sup>1</sup>, И. О. Велегжанинов<sup>1,2</sup>, Е. С. Белых<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ФГБУН Институт биологии Коми научного центра Уральского отделения РАН

<sup>2</sup>ФГБОУ ВО "Вятский государственный университет"

Поступила в редакцию 12.10.2017 г.

**Аннотация.** Последствия антропогенного загрязнения среды обитания, в том числе тяжелыми металлами, могут проявляться на разных уровнях организации живых существ. При этом несомненный интерес представляют данные о биологических реакциях и формировании адаптивного ответа у организмов из природных популяций, обитающих в условиях хронического влияния загрязняющих веществ. В нашем исследовании использованы дождевые черви *Aporrectodea caliginosa* из популяции, длительное время существующей на территории, загрязненной в результате деятельности предприятия по добыче радия из пластовых вод (Ухтинский район, Республика Коми) тяжелыми естественными радионуклидами (ТЕРН) и тяжелыми металлами (ТМ), а также на соседних интактных участках. Изучены выживаемость особей и уровень повреждений ДНК в клетках *A. caliginosa* при дополнительном действии различных концентраций Cd. Определены значения ЛД50 Cd, которые оказались выше для особей с фонового участка по сравнению со значениями для червей с импактного участка. У дождевых червей *A. caliginosa* с загрязненного участка не удалось выявить адаптивный ответ на действие Cd в более высоких концентрациях при условии предварительного хронического воздействия Cd в концентрациях, в 79–86 раз меньших, чем в лабораторном эксперименте, на фоне повышенных концентраций ТЕРН в почве. Наоборот, показана тенденция к большей чувствительности особей с импактного участка к действию Cd по сравнению с контрольными животными. Анализ собственных и литературных данных также свидетельствует о большей устойчивости *A. caliginosa* к действию высоких концентраций Cd по сравнению с другими видами дождевых червей. Предполагаем, что различия в выживаемости могут быть связаны с метаболическими изменениями в организме дождевых червей и условиями эксперимента (составом почвенного субстрата, многократным введением токсиканта). Показано, что после воздействия концентрации Cd 425 мг/кг почвы уровни повреждения ДНК дождевых червей как с фонового, так и загрязненного участков достоверно не отличались друг от друга, но оказались ниже определенного ранее спонтанного уровня повреждений.

**Ключевые слова:** техногенное загрязнение почвы, кадмий, дождевые черви, летальные концентрации, ЛД50, выживаемость, повреждение ДНК, адаптивный ответ, метод ДНК-комет

Антропогенное загрязнение окружающей среды представляет собой огромную опасность для живых организмов, воздействуя на разных уровнях их организации. Одними из распространенных поллютантов являются тяжелые металлы, многие из которых относятся к группе опасных веществ, характеризующихся высокой токсичностью и канцерогенностью. Cd входит в группу веществ I класса опасности наряду с такими химическими элементами и веществами как As, Hg, Se, Pb, Zn, F, бенз(а)пирен [1]. Представленные в литературе данные о поступлении, распределении в организме, механизмах действия и эффектах Cd

на растения и животных достаточно многочисленны [2-8]. Однако биологические реакции организмов из природных популяций, обитающих в условиях хронического влияния присутствующих в окружающей среде загрязняющих веществ, на стрессовое воздействие более высоких концентраций токсиканта изучены недостаточно. Такие исследования представляют интерес, поскольку длительное действие факторов низкой интенсивности на живые организмы может привести к формированию у организмов адаптивного ответа на действие высоких доз или концентраций факторов [9 -11].

Важнейшим и наиболее чувствительным компонентом окружающей среды является почва, трансформация которой в результате загрязнений

приводит к ухудшению её свойств как среды обитания, и впоследствии – необратимым изменениям структуры естественных популяций животных и растений. Наиболее тесно контактируют с этим элементом экосистемы почвенные животные. Они являются постоянными обитателями почвы и первыми реагируют на негативные изменения ее состояния.

Одной из важнейших групп почвенных беспозвоночных являются дождевые черви. Эти животные считаются удобными биоиндикаторами состояния окружающей среды, поскольку имеют высокую численность в поверхностном слое почвы и чувствительны к изменениям среды обитания [12, 13]. Дождевых червей активно используют в оценке состояния почв, загрязненных тяжелыми металлами, радионуклидами, нефтепродуктами и пестицидами [12, 14-17].

Действие химических веществ, в том числе солей Cd, на дождевых червей *Eisenia fetida* оценивают по выживаемости и репродуктивной функции особей, изменения которых в стандартных методиках определяют через 7, 14, 21, 28, 56 дней и 4 недели воздействия соответственно [18, 19]. Токсичность веществ хорошо отражает такой репрезентативный показатель как полуметаллическая доза (ЛД<sub>50</sub>) – концентрация вещества (элемента) в субстрате, которая вызывает гибель 50 % особей испытываемой группы.

При лабораторном изучении токсического воздействия Cd на дождевых червей используют разные виды, такие как *Eisenia fetida* [20-24], *Lumbricus rubellus* [25, 26], *Lumbricus terrestris* [22], *Aporrectodea caliginosa* [27], регистрируя биологические эффекты в широком диапазоне концентраций (от 1 до 1843 мг/кг) [20, 24] и различной продолжительности (от 7 до 296 дней) воздействия токсиканта [24, 25].

Для оценки генотоксичности веществ широко применяют показатели, отражающие степень повреждения ДНК живых организмов. Для этого с

помощью щелочной версии метода ДНК-комет определяют совокупность одностранных, двустранных разрывов и щелочно-лабильных сайтов [28-31]. Результаты исследований целостности ДНК дождевых червей при воздействии разных концентраций Cd отражены в работах [32-35].

Цель настоящей работы заключалась в определении летальных концентраций Cd для дождевых червей *Aporrectodea caliginosa*, собранных на интактной территории и загрязненной тяжелыми металлами и тяжелыми естественными радионуклидами, а также оценке степени повреждения ДНК беспозвоночных после воздействия Cd.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследования проводили на дождевых червях *Aporrectodea caliginosa*, собранных вручную на двух экспериментальных участках (Республика Коми, пос. Водный): контрольном (1), характеризующимся фоновыми содержаниями тяжелых естественных радионуклидов (ТЕРН) и тяжелых металлов (ТМ) в почве, и техногенно загрязненном (2). Характеристики почв участков представлены в таблице 1.

В каждый контейнер помещали по 6-7 и 7 особей *A. caliginosa* для исследования выживаемости и оценки уровня повреждения ДНК соответственно. Все воздействия выполнены в трех повторностях. Для каждого варианта эксперимента средняя масса дождевых червей варьировала от  $0.58 \pm 0.03$  до  $0.96 \pm 0.02$  г.

Животных содержали в пластиковых контейнерах размером 14×9×10 см, наполненных 1 кг искусственной почвы (песок: глина: торф = 5: 4: 1). До начала работы определили pH (H<sub>2</sub>O) = 8,69 ± 0,02 [36], pH (KCl) = 7,70 ± 0,02 [37], влажность – 26 ± 1 % почвенного субстрата [38]. Влажность почвенного субстрата и доступность пищи (сушеные овощи) контролировали в течение эксперимента. В почвенный субстрат кадмий вносили в виде

Таблица 1.

Удельные активности ТЕРН и концентрации ТМ в почвах исследуемых участков

Элементы	Участок 1	Участок 2
Тяжелые естественные радионуклиды, Бк/кг		
<sup>226</sup> Ra	163 ± 41	22260 ± 4779
<sup>238</sup> U	11.5 ± 0.8	306 ± 120
<sup>230</sup> Th	21.7 ± 4.1	2342 ± 837
Тяжелые металлы и As, мг/кг		
Cd	0.30 ± 0.02	14.0 ± 3.4
Hg	0.023 ± 0.002	0.507 ± 0.095
Pb	6.0 ± 0.3	408 ± 85
As	2.4 ± 0.1	143 ± 35

раствора  $\text{CdCl}_2 \times 2.5\text{H}_2\text{O}$  (ч.д.а.) (Vekton, Россия), тщательно перемешивали и выдерживали в течение суток при комнатной температуре (20–22°C).

Содержания валовых и подвижных форм Cd в почве определяли методом атомно-эмиссионной спектроскопии с индуктивно-связанной плазмой на спектрометре Spectro Ciros<sup>CCD</sup> в лаборатории «Экоаналит» ИБ Коми НЦ УрО РАН (аттестат-аккредитации РОСС RU.0001.511257). Кроме этого, основные дозобразующие радионуклиды ( $^{238}\text{U}$ ,  $^{230}\text{Th}$ ,  $^{226}\text{Ra}$ ,  $^{210}\text{Po}$ ,  $^{210}\text{Pb}$ ,  $^{232}\text{Th}$ ,  $^{228}\text{Th}$ ) в образцах почв исследуемых участков определяли стандартными методами с помощью HPGe-детектора в лаборатории миграции радионуклидов и радиохимии Института биологии Коми НЦ УрО РАН (аттестат аккредитации № САРК RU.0001.441623).

Выживаемость дождевых червей оценивали после воздействия Cd в течение 164 дней эксперимента. Внесение Cd в почву осуществлялось постепенно: первоначально контейнеры содержали 325, 375 и 425 мг/кг, затем через 30 дней воздействия в каждый сосуд вносили по 125 мг/кг, на 61-й день – 200 мг/кг, на 73-й день – 200 мг/кг, на 95-й день – 250 мг/кг Cd. Итоговые концентрации Cd составили 1100, 1150 и 1200 мг на кг почвы.

Численность беспозвоночных для каждого варианта эксперимента отмечали не реже 1 раза в три дня в течение 164 дней – времени регистрации гибели последней особи в опытных образцах с дополнительно внесённым Cd. Выживаемость *A. caliginosa* с обоих участков в контрольных вариантах эксперимента (без дополнительного химического воздействия) составила за весь период наблюдений 100 и 86 % соответственно (1 особь погибла).

На основе полученных данных определили время от начала эксперимента до момента гибели половины особей для каждого опытного варианта (далее –  $\text{LD}_{50\text{T}}$ ), соответствующее значениям действующих полуметаллических концентраций Cd за период времени T при дискретном увеличении в течение 95 суток исходной концентрации токсиканта.

Для оценки металл-индуцированных повреждений структуры ДНК применяли щелочной вариант метода ДНК-комет [29] с модификациями,

представленными нами ранее [39]. Продолжительность воздействия Cd в концентрации 425 мг/кг составляла 48 часов.

Суммарными полуметаллическими для дождевых червей концентрациями ( $\text{LD}_{50\text{T}}$ ) при многократном внесении Cd в почву считали концентрации, которые приводили к гибели 50% особей в каждом из трёх опытных вариантов на момент окончания эксперимента. Значение  $\text{LD}_{50\text{T}}$  определяли на основании данных о 50% кумулятивной выживаемости, полученной по кривым выживаемости, построенным по методу Каплана-Мейера в программе Statistica 10. Рассчитанное значение  $\text{LD}_{50}$  получали по методу Н.Г. Першина [40].

Целостность структуры ДНК оценивали по следующим показателям - процент ДНК в «хвосте кометы» (% ДНК<sub>хвост</sub>), длина «хвоста» (ДХ), момент Олив (ОМ) и момент «хвоста» (МХ) - с помощью программы CometScorePro (TriTekCorp, США) в полуавтоматическом режиме. Для анализа использовали по три повторности для каждой особи, по 100 клеток на каждом препарате. Среднее значение медиан трех повторностей использовали для статистического анализа. Наличие артефактов выявляли методом Граббса. Достоверность различий средних значений в выборках оценивали с помощью *t*-критерия Стьюдента.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Для учёта возможного влияния Cd на токсичность изменения его физико-химических форм при взаимодействии с твердой частью почвенного субстрата или в результате обменных реакций в почвенном растворе определили (табл. 2) валовое содержание и концентрацию подвижных форм элемента.

Анализ выживаемости *A. caliginosa* показал, что дождевые черви с участка 2 оказались чувствительнее к действию Cd, чем особи с участка 1 во всех вариантах эксперимента. Конечная концентрация 1100 мг/кг в опыте 1 вызвала 50-процентную смертность червей с обоих участков, но через разное время: на 131 день – с участка 1 и 105 день – с участка 2. Полуметаллические дозы 1150

Таблица 2.

Концентрации Cd (мг/кг) в почвенном субстрате

Вариант эксперимента	Концентрация Cd, мг/кг		
	рассчитанная внесённая	определённая	
		валовых форм	подвижных форм
Контроль	0	6.2 ± 1.3	2.8 ± 0.3
Опыт 1	1100	1083 ± 34	872 ± 36
Опыт 2	1150	1183 ± 61	908 ± 48
Опыт 3	1200	1350 ± 20	1092 ± 28

и 1200 мг/кг привели к гибели половины особей с участка 1 через 109 и 95 дней соответственно. В свою очередь, определённая по кумулятивным кривым медиана выживаемости дождевых червей с участка 2 для двух других вариантов эксперимента (Опыт 2, 3) составила 95 и 87 дней при концентрациях Cd 900 и 950 мг/кг соответственно, что также указывает на их меньшую устойчивость к воздействию Cd (табл. 3).

Кроме этого, рассчитанные по формуле [40] значения полулетальных доз (ЛД<sub>50</sub>) для дождевых червей каждого опытного варианта оказались ниже значений, полученных по кумулятивным кривым выживаемости особей, но также указывают на большую чувствительность особей с участка 2 (табл. 3).

Оценку чувствительности *A. caliginosa* с обоих участков к действию Cd как генотоксического агента провели с помощью щелочного варианта метода ДНК-комет, который позволяет определить, главным образом, однонитевые повреждения ДНК. Полученные результаты (табл. 4), отражают процент ДНК в «хвосте кометы», длину «хвоста», момент Олив и момент «хвоста» для клеток животных, подвергнутых действию 425 мг/кг Cd в течение 48 ч.

Уровни однонитевых повреждений ДНК в целомоцитах дождевых червей с исследуемых участков в условиях воздействия Cd достоверно (p<0.05) не отличались между собой по всем определенным показателям (табл. 4).

### ОБСУЖДЕНИЕ

Токсическое действие кадмия на выживаемость различных видов дождевых червей хорошо изучено [20-27, 41, 42] (табл. 5). Известно также, что активность метаболических процессов мини-

мальна у червей почвенно-подстилочной группы, обитающих в верхних горизонтах почвы, и возрастает у представителей норной и собственно почвенной групп [43]. При этом сообщается о наличии прямой зависимости чувствительности червей из разных групп к химическим токсикантам от метаболической активности организма, и обратной – к ионизирующему излучению.

Оценки значений полулетальных концентраций, полученных интерполяцией данных из кривых выживаемости, могут значительно отличаться при изменении продолжительности воздействия [25, 26]. Однако, даже в пределах одного исследования значения ЛД<sub>50</sub> и время, в течение которого регистрируется, гибель животных, могут значительно варьировать. Так в исследовании токсичности металла для *Eisenia andrei* [42] ЛД<sub>50</sub> снизилась в два раза при увеличении продолжительности эксперимента с 4 до 12 недель.

Также при анализе выживаемости червей следует учитывать влияние физико-химической формы элемента на его токсичность. Так, одновременное увеличение продолжительности воздействия Cd на *L. rubellus* с 21 до 296 суток и доли песчаной фракции в составе почвенной смеси с 24 до 70 % привели к смещению значения ЛД<sub>50</sub> в область более высоких концентраций [25, 26]. Указанные выше различия в количестве песка в почвенном субстрате являются объяснением парадоксального, на первый взгляд, результата о повышенной в 82,6 раз устойчивости ювенильных особей *L. rubellus* [25] по сравнению с половозрелыми [26], поскольку известно, что первые более чувствительны к токсическому воздействию тяжелых металлов [25].

Сравнение представленных в работе [27] значений ЛД<sub>50</sub> при воздействии Cd на *A. caliginosa*

Таблица 3.

Суммарные полулетальные концентрации при многократном внесении Cd в почву для дождевых червей *A. caliginosa*

Вариант эксперимента	Участок 1		Участок 2	
	ЛД <sub>50Т</sub> *	ЛД <sub>50</sub> **	ЛД <sub>50Т</sub>	ЛД <sub>50</sub>
Опыт 1	1100/131	883	1100/107	605
Опыт 2	1150/109	922	900/95	808
Опыт 3	1200/99	895	950/89	773

\* ЛД<sub>50Т</sub> – суммарные полулетальные концентрации, определенные по кривым выживаемости Каплана-Мейера

\*\* ЛД<sub>50</sub> – суммарные полулетальные концентрации [40]

Таблица 4.

Показатели повреждения ДНК в клетках *A. caliginosa* при дополнительном воздействии Cd (425 мг/кг) в течение 48 ч (M\* ± m)

Участок	n	Число проанализированных клеток	% ДНК <sub>хвост</sub>	МХ	ОМ	ДХ(пиксели)
1	20	6542	12.47 ± 0.18	0.70 ± 0.03	1.42 ± 0.03	7.07 ± 0.03
2	21	7105	12.00 ± 0.17	0.76 ± 0.04	1.48 ± 0.03	6.28 ± 0.22

\* – среднее арифметическое медиан

при продолжительности воздействия 3–8 недель и более длительном (13–23 недель) в нашем исследовании, позволяют предположить соразмерность определённых при разных условиях показателей. Рассматривая вариабельность ЛД<sub>50</sub> как статистическую обобщенную характеристику изменения выживаемости дождевых червей при различной продолжительности периода регистрации, вполне ожидаемыми выглядят отличающиеся значения ЛД<sub>50</sub> для одинаковых видов, рассчитанные разными авторами [27, наши данные, 25, 26].

Однозначная оценка полученных нами результатов затруднительна, поскольку обычно временной интервал регистрации выживших особей не превышает 56 суток согласно стандартной процедуре тестирования токсикантов. Однако данные [25], характеризующие медиану выживаемости *L. rubellus* за более длительный период наблюдений (296 сут), и определённые нами значения ЛД<sub>50</sub> при

продолжительности воздействия Cd от 95 до 164 сут согласуются с выявленной экспериментально взаимосвязью эдафических условий жизнеобитания и чувствительности дождевых червей к химическим токсикантам [43]. Так, для лабораторной популяции почвенно-подстилочных червей *L. rubellus* более чувствительных к токсическому воздействию, ЛД<sub>50/296</sub> составила 413 мг Cd/кг почвенного субстрата, а для принадлежащих к почвенной группе *A. caliginosa* ЛД<sub>50/95–164</sub> и ЛД<sub>50</sub> [40] соответствуют значениям 900–1200 мг и 605–922 Cd/кг почвы соответственно. Можно предположить, что обнаруженная нами большая устойчивость животных к острому воздействию высоких концентраций Cd обусловлена несколькими причинами: их происхождением, отличными от стандартных условиями эксперимента, в частности, ступенчатым увеличением в ходе эксперимента концентрации токсиканта в почве. Многократное

Таблица 5.

ЛД<sub>50</sub> кадмия для разных видов дождевых червей

Вид	Состав почвы	ЛД <sub>50</sub> *	Продолжительность воздействия, сут	Ссылка
<i>Eisenia fetida</i>	песок: глина: торф = 70: 20: 10 [44]	не удалось установить при воздействиях 1, 2, 5, 10 и 100 мг/кг	7, 14, 21, 28	Zaltauskaite, Sodiene, 2010
	песок: глина: торф: CaCO <sub>3</sub> = 69: 20: 10: 1 [45]	1843 (1660–2045)	14	Neuhauser et al., 1985
	песок: глина: торф: CaCO <sub>3</sub> = 69: 20: 10: 1-2 [46]	374 (317–444)	14	Fitzpatrick et al., 1996
	песок: глина (в том числе ил): торф = 77: 23(22): 1	477	14	Lock, Janssen, 2001
	песок: глина: торф = 70: 20: 10 [44]	1260		
	песок: глина (в том числе ил): торф = 11: 89 (72): 1	1520 (1290–1750)		
	песок: глина: торф = 70: 20: 10 [44]	> 300	56	Spurgeon et al., 1994
<i>Eisenia fetida andrei</i>	песок: глина: торф: CaCO <sub>3</sub> = 69: 20: 10: 1 [46]	> 1000	14	Van Gestel, Van Dis, 1988
<i>Eisenia andrei</i>	песок: глина: торф: CaCO <sub>3</sub> = 69: 20: 10: 0.5-1 [46]	588 (525–658)	28	Van Gestel et al., 1991
		522 (417–733)	42	
		421 (354–502)	56	
		303 (246–373)	70	
		253 (210–305)	84	
<i>Lumbricus rubellus</i>	песок: глина: торф = 70: 20: 10 [44]	5	21	Burgos et al., 2005
	Песок: глина (в том числе ил): навоз = 24: 76(35): 3 [47]	413 (323–529)	296	Spurgeon et al., 2004
<i>Lumbricus terrestris</i>	песок: глина: торф: CaCO <sub>3</sub> = 69: 20: 10: 1-2 [46]	256 (140–414)	14	Fitzpatrick et al., 1996
<i>Aporrectodea caliginosa</i>	природная почва, состав не указан	540 (510–560)	21–56	Khalil et al., 1996
	песок: глина: торф = 50: 40: 10	Участок 1: 1100, 883 1150, 922 1200, 895 Участок 2: 900, 605 950, 808 1100, 773	131, н/о* 109, н/о 99, н/о 95, н/о 89, н/о 107, н/о	наши данные

введение металлов в небольших концентрациях формирует устойчивость организма к последующему воздействию даже летальных концентраций этого токсиканта [48]. Использование почвенных субстратов разного механического и химического состава могут являться еще одной причиной изменения физико-химических форм Cd в почве, его биологической доступности и токсичности для организмов. Ещё один фактор, влияние которого следует учитывать при анализе полученных результатов, – это климатические условия района исследования – естественного местообитания используемых в нашем эксперименте дождевых червей. Природные популяции червей из районов с холодным климатом могут быть более устойчивы к действию ТМ, по сравнению с таковыми из более теплых регионов [49]. Полагают, что такая резистентность беспозвоночных обусловлена изменениями состава фосфолипидов клеточных мембран, зависящего от климатических условий существования популяций [50]. Температурный оптимум (25 °С) для червей, выбранных в качестве объекта в исследовании [27], на 9 °С выше, чем температура культивирования лабораторной популяции в нашем исследовании.

Известно, что у организмов, предварительно испытавших длительное давление негативных факторов низкой интенсивности, вырабатывается способность противостоять стрессовым воздействиям в высоких дозах. Это явление получило название адаптивного ответа и служит, своего рода, защитной реакцией организма [9]. Феномен адаптивного ответа подробно изучен в радиобиологии, когда действие малых доз ионизирующего излучения на организмы является адаптирующим к высоким дозам радиации [10, 11]. Адаптивный ответ на действие Cd выявлен [34] при исследовании уровней повреждения ДНК *E. fetida* из природной популяции с территории с содержанием Cd в почве 52–80 мг/кг, и лабораторной популяции, животные которой в течение 10 лет питались навозом, содержащим 0.01 % CdSO<sub>4</sub>. Показано, что дождевые черви, в среде обитания которых ранее присутствовал ксенобиотик, при выдерживании в водных растворах с концентрацией Cd 2.5, 5, 10 и 20 мг/л в течение 48 ч проявили более высокую толерантность к дополнительному острому воздействию этого металла по сравнению с червями из контрольной лабораторной популяции. Уровни повреждений ДНК *E. fetida* из «кадмиевой» лабораторной популяции и природной популяции с загрязненной территории при остром воздействии

Cd в указанных выше концентрациях достоверно не отличались от спонтанного уровня и составили 10–12 и 7–8 % соответственно [34].

Сравнение степени поврежденности ДНК после воздействия химического вещества со спонтанным для данного вида представляет собой более практичный индикатор чувствительности, чем простое сопоставление уровней повреждения ДНК при воздействии токсиканта для разных организмов [32]. Ранее для червей *A. caliginosa* в нескольких экспериментах нами определены спонтанные уровни повреждения ДНК, которые для особей участков 1 и 2 не отличались и составляли от  $16,0 \pm 0,5$  до  $16,4 \pm 1,4$  % [39]. % ДНК в «хвосте», полученный [32] при оценке уровня повреждения ДНК *A. caliginosa* в отсутствие какого-либо дополнительного воздействия, составил  $16,13 \pm 4,43$  %.

В настоящем исследовании показано, что количество ДНК, мигрировавшей в «хвост кометы», у особей с участков 1 и 2 при воздействии Cd не отличалось и составило  $12,47 \pm 0,18$  и  $12,00 \pm 0,17$  соответственно. Данные уровни повреждения ДНК оказались достоверно ( $p < 0,05$ ) ниже спонтанного, определенного в предыдущем эксперименте. Возможно, снижение спонтанного уровня повреждений ДНК под воздействием генотоксического агента Cd вызвано активированием системы репарации ДНК у дождевых червей с двух участков с одинаковой интенсивностью.

Однако результаты теста на выживаемость дождевых червей свидетельствуют о большей чувствительности *A. caliginosa* с участка 2 к дополнительному острому химическому воздействию. Используемые в эксперименте черви были отобраны из природных популяций, в течение долгого времени (не менее 8–10 поколений) существовавших в условиях фонового и повышенного содержания ТМ и ТЕРН в почвах. Известно, что детоксикация токсических металлов, например, Cd в организмах беспозвоночных происходит при участии белков металлотионеинов, богатых сульфатами и цистеином. Уровень экспрессии этих соединений у червей может конститутивно повышаться, например, в популяциях, которые населяют почвы, загрязненные ТМ, преимущественно Cu [51].

Следует отметить, что в нашем случае *A. caliginosa* испытали хроническое воздействие не только ТМ, но и ТЕРН, являющихся источниками ионизирующего излучения. Согласно представленным А.Г. Викторовым [43] значениям ЛД<sub>50</sub> при облучении дождевых червей, *A. caliginosa* являются самыми выносливыми к радиацион-

ному воздействию. ЛД<sub>50</sub> равны 1120 ± 30 и 1340 ± 60 Гр для курской и уральской популяций *A. caliginosa* соответственно. Тогда как другие виды семейства Lumbricidae оказались более чувствительны к острому обучению: ЛД<sub>50</sub> для червей *E. nordenskioldi* составили 1060 ± 100, *A. rosea* – 570 ± 60, *E. fetida* – 20 и 600 (по данным разных авторов), *L. rubellus* – 100 и менее 600 Гр (по данным разных авторов) [43]. Загрязнение почвы участка 2 ТЕРН, основным дозообразующим из которых является <sup>226</sup>Ra, могло стать еще одной из причин отсутствия устойчивости к Cd червей населяющей его популяции, поскольку α-частицы обладают высокой биологической эффективностью. Авторы исследований [52], посвящённых изучению биологических эффектов в природных популяциях растений при хроническом радиационном воздействии, сообщают, что на участках с повышенным содержанием α-излучающих радионуклидов в почве не наблюдали усиления процессов репарации ДНК и адаптационных изменений у растений, корневая система которых постоянно подвергается как внешнему, так и внутреннему облучению. Считают, что отсутствие адаптационного ответа у растений, предварительно подвергнутых хроническому низкоинтенсивному стрессу, при остром токсическом или радиационном воздействии может быть обусловлено снижением пролиферативной активности повреждённых клеток, высокой биологической эффективностью α-излучения и сложным взаимодействием действующих факторов в техногенно загрязнённых почвах [52, 53].

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Оценка выживаемости *A. caliginosa*, собранных с участков, контрастных по степени загрязнения ТМ и ТЕРН, показала, что дождевые черви с фоновой территории обладают большей устойчивостью при остром воздействии Cd. Об этом свидетельствуют значения ЛД<sub>50</sub> для Cd, оказавшихся выше для особей с участка 1, чем для червей с участка 2 при всех вариантах воздействия. Таким образом, при условии предварительного хронического действия Cd в концентрациях, в 79–86 раз меньших, чем в лабораторном эксперименте, на фоне повышенных концентраций ТЕРН в почве, у дождевых червей *A. caliginosa* с участка 2 мы не наблюдали адаптивный ответ на действие Cd в более высоких концентрациях.

ЛД<sub>50</sub> для Cd, рассчитанные для червей с обоих исследованных участков, оказались выше соответствующих значений, полученных в исследова-

нии [27]. Полагаем, что различия в выживаемости червей, определенной нами и представленной в работе [27], могут быть связаны как с условиями эксперимента (составом почвенного субстрата и многократным введением токсиканта), так и с метаболическими изменениями в организме животных, приспособленных жить в условиях низких температур.

Показано, что уровни повреждения ДНК дождевых червей после воздействия 425 мг Cd/кг как с фонового, так и импактного участков не отличались друг от друга, но оказались ниже определенного ранее спонтанного уровня повреждения.

*Работа выполнена в рамках государственного задания ИБ Коми НЦ УрО РАН № АААА-А18-118011190102-7 «Механизмы биогенной миграции радионуклидов и закономерности возникновения отдаленных последствий индуцированных у растений и животных в условиях хронического радиационного и химического воздействия».*

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- ГОСТ 17.4.1.02 – 83. Охрана природы. Почвы. Классификация химических веществ для контроля загрязнения. Москва: Стандартинформ. 2008. 4 с.
- Fojtova M., Kovarik A. // Plant, cell and environment. 2000. Vol. 23, pp. 531-537.
- Неваленный А.Н., Бедняков Д.А. // Экология. 2004. № 2. С. 152-155.
- Benavides M.P., Gallego S.M., Tomaro M.L. // Braz. J. Plant Physiol. 2005. Vol. 17, pp. 21-34.
- Селезнева Е.М., Гончарова Л.И., Белова Н.В. // Агрехимия. 2008. № 4. С. 82-86.
- Нуртдинова Д.В. // Естественные науки. 2010. № 3. С. 126-134.
- Батова Ю.В., Лайдинен Г.Ф., Казнина Н.М., Титов А.Ф. // Агрехимия. 2012. №6. С. 79-83.
- Казнина Н.М., Титов А.Ф., Лайдинен Г.Ф., Батова Ю.В. // Труды Карельского научного центра Российской Академии наук. 2013. № 3. С. 112-118.
- Crawford D.R., Davies K.J.A. // Environmental Health Perspectives. 1994. Vol. 102 (Suppl 10), pp. 25-28.
- Григоркина Е.Б. // Доклады Академии наук. 2010. Т. 430. №4. С. 565-567.
- Григоркина Е.Б., Оленев Г.В., Пашнина И.А. // Международный журнал экспериментального образования. 2013. № 11. С. 81-85.
- Криволицкий Д.А. Почвенная фауна в экологическом контроле. Москва, Наука, 1994, 270 с.
- Fründ H.C., Graefe U., Tischer S. // Biology of Earthworms (Soil Biology, 24) Chapter 16. Springer, Berlin, Heidelberg. 2011, vol. 24, pp. 261-278.

14. Смольникова В.В. // Вестник Северо-Кавказского федерального университета. 2011. № 1. С. 95-99.
15. Прокофьев И.Л., Голощапова С.С. // Вестник Брянского государственного университета. 2014. № 4. С. 164-168.
16. Чачина С.Б., Голованова Е.В. // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. 2014. № 8-3. С. 101-104.
17. Резниченко И.С. // Современные проблемы науки и образования. 2016. № 6. С. 503.
18. ГОСТ 33036 – 2014. Методы испытаний химической продукции, представляющей опасность для окружающей среды. Определение острой токсичности для дождевых червей (OECD, Test No 207:1984, IDT). Москва: Стандартинформ. 2015. 6 с.
19. ГОСТ 33042 – 2014. Методы испытаний химической продукции, представляющей опасность для окружающей среды. Тест на репродуктивность дождевых червей (*Eisenia fetida*/*Eisenia andrei*) (OECD, Test No 222:2004, IDT). Москва: Стандартинформ. 2015. 16 с.
20. Neuhauser E. F., Loehr R. C., Milligan D. L., Malecki M. R. // *Biol. Fertil. Soils*. 1985. Vol. 1, pp. 149-152.
21. Spurgeon D.J., Hopkin S.P., Jones D.T. // *Pollution*. 1994. Vol. 84, pp. 123-130.
22. Fitzpatrick L.C., Muratti-Ortiz J.F., Venables B.J., Goven A.J. // *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 1996. Vol. 57, pp. 63-68.
23. Lock K., Janssen C.R. // *Ecotoxicology*. 2001. Vol. 10, pp. 315-322.
24. Žaltauskaitė J., Sodienė I. // *EKOLOGIJA*. 2010. Vol. 56, No. 1-2, pp. 10-16.
25. Spurgeon D.J., Svendsen C., Kille P., Morgan A. J., Weeks J. M. // *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2004. Vol. 57, pp. 54-64.
26. Burgos M.G, Winters C., Stürzenbaum S.R, Randerson P.F, Kille P., Morgan A.J. // *Environ. Sci. Technol.* 2005. Vol. 39, pp. 1757-1763.
27. Khalil M.A., Abdel-Lateif H.M., Bayoumi B.M., van Straalen N.M., van Gestel C.A.M. // *Pedobiologia*. 1996. Vol. 40, pp. 548-556.
28. Fairbairn D.W., Olive P.L., O'Neill K.L. // *Mutation Research*. 1995. Vol. 339, pp. 37-59.
29. Tice R.R., Agurell E., Anderson D., Burlinson B., Hartmann A., Kobayashi H., Miyamae Y., Rojas E., Ryu J.C., Sasaki Y.F. // *Environmental and Molecular Mutagenesis*. 2000. Vol. 35, pp. 206-221.
30. Collins A.R. // *Molecular biotechnology*. 2004. Vol. 26, pp. 249-261.
31. Olive, P.L., Banath J.P. // *Nat. Protoc.* 2006. Vol. 1, pp. 23-29.
32. Fourie F., Reinecke S.A., Reinecke A.J. // *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2007. Vol. 67, pp. 361–368.
33. Li M., Liu Z., Xu Y., Cui Y., Li D., Kong Z. // *Chemosphere*. 2009. Vol. 74, pp. 621-625.
34. Voua Otomo P., Reinecke S.A. // *Ecotoxicology*. 2010. Vol. 19, pp. 362–368.
35. Liang S.-H., Chen S.-C., Chen C.-Y., Kao C.-M., Yang J.-I., Shieh B.-S., Chen J.-H., Chen C.-C. // *Pedobiologia*. 2011. Vol. 54, pp. 333–340.
36. ГОСТ 26423 – 85. Почвы. Методы определения удельной электрической проводимости, рН и плотного остатка водной вытяжки. Москва: Стандартинформ. 2011. 8 с.
37. ГОСТ 26483 – 85. Почвы. Приготовление солевой вытяжки и определение ее рН по методу ЦИНАО. Москва: Изд-во стандартов. 1985. 6 с.
38. ГОСТ 28268 – 89. Почвы. Методы определения влажности, максимальной гигроскопической влажности и влажности устойчивого завядания растений. Москва: Стандартинформ. 2011. 8 с.
39. Канева А.В., Белых Е.С., Майстренко Т.А., Шадрин Д.М., Пылина Я.И., Велегжанинов И.О. // *Радиационная биология. Радиоэкология*. 2015. Т. 55. № 1. С. 24–34.
40. Бельский М.Л. Элементы количественной оценки фармакологического эффекта. Ленинград: Медгиз. [Ленингр. отд-ние], 1963, 152 с.
41. van Gestel C.A.M., van Dis W.A. // *Biol Fertil Soils*. 1988. Vol. 6, pp. 262- 265.
42. van Gestel C.A.M., van Dis W.A., Dirven-van Breemen E.M., Sparenburg P.M., Baerselman R. // *Biol Fertil Soils*. 1991. Vol. 12, pp. 117-121.
43. Кривошукский Д.А. Биоиндикация радиоактивных загрязнений. Москва, Наука, 1999, 384 с.
44. OECD guidelines for testing of chemicals: Earthworm acute toxicity test. Paris, France. 1984. N. 207.
45. EEC Guidelines for the Testing of Chemicals. The contact and artificial soil tests. EEC 79/831. 1982. Rev. 3
46. EEC Directive 79/831. Annex V. Part C: Methods for the Determination of Ecotoxicity. Level I. C (L1) 4: Toxicity for Earthworms. Artificial Soil Test. Commission of the European Communities. DG XI/128/82. Final. 1985.
47. Butt K.R. // *Biol. Fertil. Soils*. 1993. Vol. 16, pp. 135–138.
48. Божков А.И., Сидоров В.И., Длубовская В.Л., Шевцова М.Я., Суоров Ю.Н. // *Биомедицин-*

ская химия. 2010. Т. 56. Вып. 2. С. 195-208.

49. Bindesbøl A.-M., Bayley M., Damgaard C., Holmstrup M. // *Environ Toxicol Chem.* 2009. Vol. 28 (11), pp. 2341-7.

50. Fisker K. V., Bouvrais H., Overgaard J., Schöttner K., Ipsen J. H., Holmstrup M. // *J Comp Physiol B.* 2015. Vol. 185 (4), pp. 389-400.

51. Mustonen M., Haimi J., Väisänen A., Knott K. E. // *Ecotoxicology.* 2014. Vol. 23 (9), pp. 1732-43.

52. Geras'kin S.A., Oudalova A.A., Dikarev V.G., Dikareva N.S., Mozolin E.M., Hinton T.G., Spiridonov S.I., Copplestone D., Garnier-Laplace J. // *Journal of Environmental Radioactivity.* 2012. Vol. 104, pp. 55-63.

53. Серебряный А.М., Зоз Н.Н. // *Генетика растений.* 2002. Т. 38. № 3. С. 340-346.

*Институт биологии Коми НЦ УрО РАН  
Рыбак А. В., м.н.с. отдела радиоэкологии  
Тел.: +7 (8212) 31-28-75  
E-mail: canewa.anuta@yandex.ru*

*Institute of biology of Komi SC Ural Division of RAS  
Rybak A. V., junior researcher of radioecology  
department  
Ph.: +7 (8212) 31-28-75  
E-mail: canewa.anuta@yandex.ru*

*Майстренко Т. А., с.н.с. отдела радиоэкологии  
Тел.: +7 (8212) 31-28-75  
E-mail: roginat@mail.ru*

*Maystrenko T. A., senior researcher of  
radioecology department  
Ph.: +7 (8212) 31-28-75  
E-mail: maystrenko@ib.komisc.ru*

*Велегжанинов И. О., с.н.с. отдела радиоэкологии  
Тел.: +7 (8212) 31-28-75  
E-mail: vellio@yandex.ru*

*Velegzhaninov I. O., senior researcher of  
radioecology department  
Ph.: (8212)31-28-75  
E-mail: vellio@yandex.ru*

*Белых Е. С., н.с. отдела радиоэкологии  
Тел.: +7 (8212) 31-28-75  
E-mail: daryd22@gmail.com*

*Belykh E. S., researcher of radioecology  
department  
Ph.: +7 (8212) 31-28-75  
E-mail: daryd22@gmail.com*

## THE INFLUENCE OF CADMIUM ON EARTHWORMS, INHABITING THE BACKGROUND AND ANTHROPOGENICALLY CONTAMINATED AREAS

A. V. Rybak<sup>1</sup>, T. A. Maystrenko<sup>1</sup>, I. O. Velegzhaninov<sup>1,2</sup>, E. S. Belykh<sup>1</sup>

<sup>1</sup> *Institute of Biology, Komi Scientific Center, Ural Branch, Russian Academy of Sciences,*

<sup>2</sup> *Vyatka State University*

**Abstract.** The effects of anthropogenic contamination of the environment including heavy metals could be observed on different levels of living matter organization. Data of biological responses and adaptation abilities of organisms from natural populations surviving under chronic exposure of contaminants are of obvious interest. Earthworms *Aporrectodea caliginosa* from population long time inhabiting the area polluted with radionuclides of natural origin and heavy metals as a result of the radium production from stratal water (Uchta region, Komi Republic) and also adjacent intact territories. The survival rate and level of DNA damage were investigated in earthworms *A. caliginosa* exposed to different concentrations of Cd. LC50 of Cd defined were higher for individuals sampled from the reference site as compared with those from the impacted one. No adaptive response on high concentrations of Cd was found in *A. caliginosa* inhabited the contaminated area with enhanced radioactive background under chronic exposure of Cd 79–86 times lower than in the laboratory experiment. On the contrary a tendency to higher sensitivity to Cd of individuals from

the contaminated area was shown as compared with reference animals. Data obtained ourselves and taken from literary sources give evidences on higher resistance of *A. caliginosa* to high concentrations of Cd as compared with other species of earthworms. Differences in survival rates were supposed to be resulted from metabolic changes in the earthworm organisms and the experiment conditions (the soil substrate composition, multiple toxicant introductions). The level of DNA damages in earthworms from the reference and the contaminated sites were not differ from each other after Cd exposure in concentration of 425 mg/kg of soil but the values obtained were lower than the spontaneous level defined earlier.

**Keywords:** anthropogenic contamination of soil, cadmium, earthworms, lethal concentrations, LC<sub>50</sub>, survival rate, DNA damage, adaptive response, Comet assay

## REFERENCES

1. GOST 17.4.1.02 – 83. Ochrana prirody. Pochvy. Klassifikacija himicheskikh veshhestv dlja kontrolja zagryznenija. Moskva: Standartinform, 2008, 4 s.
2. Fojtova M., Kovarik A., Plant, cell and environment, 2000, Vol. 23, pp. 531-537. DOI: 10.1590/S1677-04202005000100003 Available at: Wiley on-line library (wiley.com).
3. Nevalenyyi A.N., Bednyakov D.A., Russian Journal of Ecology, 2004, No. 2, pp. 128-130.
4. Benavides M.P., Gallego S.M., Tomaro M.L., Braz. J. Plant Physiol, 2005, Vol. 17, pp. 21-34. DOI: 10.1590/S1677-04202005000100003 Available at: Scientific Electronic Library Online Brasil (scielo.br).
5. Selezneva E.M., Goncharova L.I., Belova N.V., Agrochemistry, 2008, No. 4, pp. 82-86.
6. Nurtdinova D.V., Natural Sciences, 2010, No. 3, pp. 126-134.
7. Batova Yu.V., Laidinen G.F., Kaznina N.M., Titov A.F., Agrochemistry, 2012, No. 6, pp. 79-83.
8. Kaznina N.M., Titov A.F., Laidinen G.F., Batova Yu.V., Works of Karelian Scientific Center of RAS, 2013, No. 3, pp. 112-118.
9. Crawford D.R., Davies K.J.A., Environmental Health Perspectives, 1994, Vol. 102 (Suppl 10), pp. 25-28. Available at: NCBI (ncbi.nlm.nih.gov).
10. Grigorkina E.B., Reports of the Academy of Sciences, 2010, Vol. 430, No. 4, pp. 565-567.
11. Grigorkina E. B., Olenov G.V., Pashnina I.A., International Journal of experimental education, 2013, No. 11, pp. 81-85.
12. Krivoluckij D. A. Pochvennaja fauna v jekologicheskom kontrole. Moskva, Nauka, 1994, 270 s.
13. Fründ H.C., Graefe U., Tischer S. Earthworms as Bioindicators of Soil Quality. In: Karaca A. (eds) Biology of Earthworms (Soil Biology, 24) Chapter 16. Springer, Berlin, Heidelberg, 2011, V. 24, pp. 261-278. DOI: 10.1007/978-3-642-14636-7\_16 Available at: Springer (springer.com).
14. Smolnikova V.V., Bulletin of the North Caucasus Federal University, 2011, No. 1, pp. 95-99.
15. Prokofiev I.L., Goloshchapova S.S., Bulletin of the Bryansk state University, 2014, No. 4, pp. 164-168.
16. Chachina S.B., Golovanova E.V., International journal of applied and fundamental researches, 2014, No. 8-3, pp. 101-104.
17. Reznichenko I.S., Modern problems of science and education, 2016, No. 6, pp. 503.
18. GOST 33036 – 2014. Metody ispytaniy himicheskoy produkcii, predstavljajushhej opasnost dlja okruzhajushhej sredy. Opredelenie ostroj toksichnosti dlja dozhdevykh chervej (OECD, Test No 207:1984, IDT). Moskva, Standartinform, 2015, 6 s.
19. GOST 33042 – 2014. Metody ispytaniy himicheskoy produkcii, predstavljajushhej opasnost' dlja okruzhajushhej sredy. Test na reproduktivnost dozhdevykh chervej (*Eisenia fetida*/*Eisenia andrei*) (OECD, Test No 222:2004, IDT). Moskva, Standartinform, 2015, 16 s.
20. Neuhauser E. F., Loehr R. C., Milligan D. L., Malecki M. R., Biol. Fertil. Soils, 1985, Vol. 1, pp. 149-152. DOI: 10.1007/BF00301782 Available at: Springer (springer.com).
21. Spurgeon D.J., Hopkin S.P., Jones D.T., Pollution, 1994, Vol. 84, pp. 123-130. DOI: 10.1016/0269-7491(94)90094-9 Available at: Science Direct (sciencedirect.com).
22. Fitzpatrick L.C., Muratti-Ortiz J.F., Venables B.J., Goven A.J., Bull. Environ. Contam. Toxicol, 1996, Vol. 57, pp. 63-68. Available at: Google Scholar (scholar.google.ru).
23. Lock K., Janssen C.R., Ecotoxicology, 2001, Vol. 10, pp. 315-322. DOI: 10.1023/A:1016767519556 Available at: Springer (springer.com).
24. Žaltauskaitė J., Sodienė I., EKOLOGIJA, 2010, Vol. 56, No. 1-2, pp. 10-16. DOI: 10.2478/v10055-010-0002-z Available at: Google Scholar (scholar.google.ru).
25. Spurgeon D.J., Svendsen C., Kille P., Morgan A. J., Weeks J. M., Ecotoxicology and Environmental Safety, 2004, Vol. 57, pp. 54-64. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2003.08.003 Available at: Science Direct (sciencedirect.com).
26. Burgos M.G, Winters C., Stürzenbaum S.R., Randerson P.F, Kille P., Morgan A.J., Environ. Sci. Technol, 2005, Vol. 39, pp. 1757-1763. DOI: 10.1021/

es049174x Available at: Google Scholar (scholar.google.ru).

27. Khalil M.A., Abdel-Lateif H.M., Bayoumi B.M., van Straalen N.M., van Gestel C.A.M., *Pedobiologia*, 1996, Vol. 40, pp. 548-556. Available at: Google Scholar (scholar.google.ru).

28. Fairbairn D.W., Olive P.L., O'Neill K.L., *Mutation Research*, 1995, Vol. 339, pp. 37-59. DOI: 10.1016/0165-1110(94)00013-3 Available at: Science Direct (sciencedirect.com).

29. Tice R.R., Agurell E., Anderson D., Burlinson B., Hartmann A., Kobayashi H., Miyamae Y., Rojas E., Ryu J.C., Sasaki Y.F., *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 2000, Vol. 35, pp. 206-221. DOI: 10.1002/(SICI)1098-2280(2000)35:33.0.CO;2-J Available at: Wiley Online Library (wiley.com).

30. Collins A.R., *Molecular biotechnology*, 2004, Vol. 26, pp. 249-261. DOI: 10.1385/1-59259-179-5:163 Available at: NCBI (ncbi.nlm.nih.gov).

31. Olive, P.L., Banath J.P., *Nat. Protoc*, 2006, Vol. 1, pp. 23-29. DOI: 10.1038/nprot.2006.5 Available at: Nature Protocols (nature.com).

32. Fourie F., Reinecke S.A., Reinecke A.J., *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2007, Vol. 67, pp. 361-368. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2006.10.005 Available at: Science Direct (sciencedirect.com).

33. Li M., Liu Z., Xu Y., Cui Y., Li D., Kong Z., *Chemosphere*, 2009, Vol. 74, pp. 621-625. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2008.10.048 Available at: Science Direct (sciencedirect.com).

34. Voua Otomo P., Reinecke S.A., *Ecotoxicology*, 2010, Vol. 19, pp. 362-368. DOI: 10.1007/s10646-009-0418-y Available at: Springer (springer.com).

35. Liang S.-H., Chen S.-C., Chen C.-Y., Kao C.-M., Yang J.-I., Shieh B.-S., Chen J.-H., Chen C.-C., *Pedobiologia*, 2011, Vol. 54, pp. 333-340. DOI: 10.1016/j.pedobi.2011.07.011 Available at: Science Direct (sciencedirect.com).

36. GOST 26423 – 85. Pochvy. Metody opredelenija udelnoj jelektricheskoj provodivosti, pH i plotnogo ostatka vodnoj vytjazhki. Moskva, Standartinform, 2011, 8 s.

37. GOST 26483 – 85. Pochvy. Prigotovlenie solevoj vytjazhki i opredelenie ee pH po metodu CINA0. Moskva, Izd-vo standartov, 1985, 6 s.

38. GOST 28268–89. Pochvy. Metody opredelenija vlazhnosti, maksimalnoj gigroskopicheskoj vlazhnosti i vlazhnosti ustojchivogo zavjadaniya rastenij. Moskva, Standartinform, 2011, 8 s.

39. Kaneva A.V., Belykh E.S., Maystrenko T.A., Shadrin D.M., Pylina Y.I., Velegzhaninov I.O., *Radiation biology. Radioecology*, 2015, Vol. 55, No.

1, pp. 24–34.

40. Belenkij M.L. Jelementy kolichestvennoj ocenki farmakologicheskogo jeffekta. Leningrad, Medgiz. [Leningr. otd-nie], 1963, 152 s.

41. van Gestel C.A.M., van Dis W.A., *Biol Fertil Soils*, 1988, Vol. 6, pp. 262- 265. DOI: 10.1007/BF00260822 Available at: Springer (springer.com).

42. van Gestel C.A.M., van Dis W.A., Dirven-van Breemen E.M., Sparenburg P.M., Baerselman R., *Biol Fertil Soils*, 1991, Vol. 12, pp. 117-121. DOI: 10.1007/BF00341486 Available at: Springer (springer.com).

43. Krivoluckij D.A. Bioindikacija radioaktivnyh zagraznenij. Moskva, Nauka, 1999, 384 s.

44. OECD guidelines for testing of chemicals: Earthworm acute toxicity test. Paris, France, 1984, N. 207.

45. EEC Guidelines for the Testing of Chemicals. The contact and artificial soil tests, EEC 79/831, 1982, Rev. 3.

46. EEC Directive 79/831. Annex V. Part C: Methods for the Determination of Ecotoxicity. Level I. C (L1) 4: Toxicity for Earthworms. Artificial Soil Test. Commission of the European Communities, DG XI/128/82, Final, 1985.

47. Butt K.R., *Biol. Fertil. Soils*, 1993, Vol. 16, pp. 135–138. DOI: 10.1007/BF00369415 Available at: Springer (springer.com).

48. Bozhkov A.I., Sidorov V.I., Dlubovskaya V.L., Shevtsova M.Ya., Surov Yu.N., *Biomedical chemistry*, 2010, Vol. 56, No. 2, pp. 195-208.

49. Bindesbøl A.-M., Bayley M., Damgaard C., Holmstrup M., *Environ Toxicol Chem*, 2009, Vol. 28 (11), pp. 2341-7. DOI: 10.1897/09-078.1 Available at: Wiley Online Library (wiley.com).

50. Fisker K. V., Bouvrais H., Overgaard J., Schöttner K., Ipsen J. H., Holmstrup M., *J Comp Physiol B*, 2015, Vol. 185 (4), pp. 389-400. DOI: 10.1007/s00360-015-0895-7 Available at: Springer (springer.com).

51. Mustonen M., Haimi J., Väisänen A., Knott K. E., *Ecotoxicology*, 2014, Vol. 23 (9), pp. 1732-43. DOI: 10.1007/s10646-014-1338-z Available at: Springer (springer.com).

52. Geras'kin S.A., Oudalova A.A., Dikarev V.G., Dikareva N.S., Mozolin E.M., Hinton T.G., Spiridonov S.I., Coppelstone D., Garnier-Laplace J., *Journal of Environmental Radioactivity*, 2012, Vol. 104, pp. 55-63. DOI: 10.1016/j.jenvrad.2011.09.015 Available at: Science Direct (sciencedirect.com).

53. Serebryanyi A.M., Zoz N.N., *Plant genetics*, 2002, Vol. 38, No. 3, pp. 340-346.