Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования
«Омский государственный педагогический университет»

На правах рукописи

Резниченко Иван Сергеевич

ВЛИЯНИЕ ВЫБРОСОВ СРЕДНЕУРАЛЬСКОГО МЕДЕПЛАВИЛЬНОГО ЗАВОДА НА ПОПУЛЯЦИИ ДОЖДЕВЫХ ЧЕРВЕЙ

03.02.08 – Экология (биология)

Диссертация
на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель
кандидат биологических наук
Голованова Елена Васильевна

Омск – 2017

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ ... 3
1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ ... 10
1.1. Некоторые особенности экологии и биологии дождевых червей ... 10
1.2. Влияние выбросов металлургической промышленности на население дождевых червей ... 21
1.3. Накопление тяжелых металлов в тканях дождевых червей ... 27
2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ... 38
2.1. Характеристика исследуемых площадок ... 39
2.2. Методы сбора ... 41
2.3. Методы лабораторных исследований ... 42
2.4. Статистический анализ ... 47
3. РЕАКЦИЯ ДОЖДЕВЫХ ЧЕРВЕЙ НА ЗАГРЯЗНЕНИЕ ПОЧВ В ЕСТЕСТВЕННЫХ УСЛОВИЯХ ... 49
3.1. Изменение характеристик населения люмбрицид в зависимости от расстояния до источника эмиссии в полевых условиях ... 49
3.2. Изменение морфологических характеристик P. diplotetratheca в полевых условиях ... 55
4. РЕАКЦИЯ ДОЖДЕВЫХ ЧЕРВЕЙ НА ЗАГРЯЗНЕНИЕ ПОЧВ В ЛАБОРАТОРНЫХ УСЛОВИЯХ ... 58
4.1. Показатели населения дождевых червей ... 58
4.2. Сравнительный анализ методик очистки содержимого пищеварительного тракта дождевых червей для экотоксикологических исследований ... 77
4.3. Содержание тяжелых металлов в тканях дождевых червей, собранных на различном расстоянии от точечного источника эмиссии ... 80
ЗАКЛЮЧЕНИЕ ... 84
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ И ЛИТЕРАТУРЫ ... 90
Приложение А ... 118
Приложение Б ... 120

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования. Масштабы подверженных загрязнению земель, находящихся в зоне воздействия точечных источников эмиссии, более обширны, чем данные о статистике выбросов этих производств (Некрасова, 1993; Perlatti et al., 2014). Исследование загрязнения окружающей среды проводят с помощью химического анализа почвы, подстилки, подземных и поверхностных вод. Но при этом еще должны изучаться живые компоненты (Самойлова, 1990; Евгеньев, 1999; Ковальчук и др., 2002; Francesco et al., 2011 и др.). Это позволяет проследить не только действие одного ингредиента загрязнения, а их влияние в сочетании, т.к. зачастую они могут усиливать или ослаблять действие друг друга (Водяницкий, 2005). Оценка влияния интегральной токсичности нередко проводится с использованием дождевых червей (семейство Lumbricidae) (Takeshi et al., 2011; Frouz et al., 2013). Такого рода оценка прописана в международных стандартах ISO 11268-1, ISO 11268-2, ISO 11268-3 (ISO, 1995; ISO, 1998; ISO, 1999). Дождевые черви модифицируют органическое вещество почв как химически, так и физически, смешивая подстилку с почвой, формируя и стабилизируя агрегаты, тем самым дренируя почвы (Lavelle, 2001; Zorn et al, 2008; Ngo et al, 2011; Agbaire et al, 2012). Они оказывают влияние на другие организмы, такие как растения, улучшая их корневое питание (Brown et al., 2000), микроорганизмы, увеличивая количество доступного азота в почве (Lavelle et al. 1995; Xu et al., 2013; Терещенко и др., 2013), некоторых паразитических гельминтов, уничтожая их (Hill et al., 2013) и беспозвоночных, для которых дождевые черви являются кормовой базой (Lavelle, 1996). По этим причинам червей называют инженерами экосистем (Jones et al., 1994). Эколого-биологические свойства дождевых червей и их стресс-реакция на загрязнение субстрата, по мнению многих авторов, соответствуют требованиям международных стандартов к выбору биоиндикаторов (Новакова, 1983; Криволуцкий, 1985; Morgan, 1998; Smith et al., 2012 и др.).

Территории, которые находятся в зоне влияния крупных промышленных предприятий, могут являться модельными объектами для анализа закономерностей реакции биоты на токсическую нагрузку (Воробейчик и др., 1994). В 1989–1991 гг. в одном из таких районов – возле Среднеуральского медеплавильного завода (СУМЗ), крупнейшего предприятия Урала, – была исследована трансформация населения почвенной мезофауны (Воробейчик, 1990, 1991, 1998; Воробейчик и др., 1994). Через 15 лет (в 2004 г.), практически на тех же пробных площадях, авторы провели повторные почвенно-зоологические работы (Воробейчик и др., 2007). Но и в данной работе дождевые черви рассматривались только как компонент мезофауны, где изменение показателей фауны объяснялось содержанием металлов в почве. Поэтому всестороннее изучение реакции дождевых червей на данное загрязнение, как в полевых, так и лабораторных условиях, представляет большой научный интерес.

Цель работы: изучение влияния выбросов Среднеуральского медеплавильного завода на популяции дождевых червей.

Исходя из настоящей цели, решались следующие **задачи**:

1. проанализировать в полевых условиях изменение показателей популяций дождевых червей на различном расстоянии от Среднеуральского медеплавильного завода;
2. изучить влияние комплекса ингредиентов загрязнения почв (Cu, Pb, Cd, Zn на фоне подкисления SO_2) на дождевых червей в условиях вермикультивирования;
3. выявить наиболее оптимальную методику очищения пищеварительного тракта дождевых червей для анализа содержания тяжелых металлов;
4. установить содержание тяжелых металлов (Cu, Pb, Cd, Zn) в тканях дождевых червей, собранных на различном расстоянии от Среднеуральского медеплавильного завода.

Степень разработанности темы исследования. Большой вклад в изучение роли дождевых червей в лесных и агроэкоситемах был внесен

советскими исследователями О.В. Чекановской (1960), О.В. Семеновой (1969), Т.С. Перель (1977) и др. Вопросы, связанные с приспособлением люмбрицид к неблагоприятным факторам окружающей среды, в том числе и антропичекого характера, подробно рассмотрены в работах зарубежных авторов, таких, как D.F. Cotton, J.P. Curry (1980), B.T. Lee (1985), P.J. Bohlen (1996), C.A. Edwards et al. (1998), R. Sherman (2001) B.G. Jamieson (2002), M.H. Garvin et al. (2003), A. Tato et al. (2006), A. Ceballos, C. Fragoso (2006), L. Gago-Duport et al. (2008).

В настоящее время изучается влияние токсического воздействия медеплавильных производств (Средний и Южный Урал) на экосистемы (Безель и др., 2010; Воробейчик и др., 2012).

Прикладные аспекты экологического и физиологического характера с использованием технологии вермикультивирования отражены в современных работах P.F. Hendrix, P.J. Bohlen (2002), R.C. Le Bayon (2004), N.M. Van Straalen et al. (2005), B.T. Lee, K.W. Kim (2008), M. Potthoff et al. (2008), L. Gago-Duport et al. (2008), A.P. Vig et al. (2011), A. Yadav et al. (2011), J. Kang et al. (2011), F. Nannoni et al. (2011), J. Singh et al. (2012), M.Y. Xing et al. (2012), A. Neaman et al. (2012), S. Hait et al. (2012), P.O. Agbaire et. al. (2012), C.F. Zhou et al. (2013), J. Singh et al. (2013), P.S. Chaudhuri et. al. (2014), M. Aja et al. (2014) и др.

Несмотря на широкую изученность реакции дождевых червей на токсическую нагрузку, существует ряд недостаточно изученных вопросов, связанных с воздействием токсических веществ, которые, как правило, в естественных уловиях присутствуют в виде комплексов и могут усиливать действие друг друга. Комплексное изучение влияния поллютантов в естественных и лабораторных условиях на разные виды дождевых червей может существенно расширить информативность в понимании действия определенных загрязняющих веществ на экосистемы.

Научная новизна. Впервые проведён комплексный анализ влияния выбросов медеплавильного завода (Cu, Pb, Cd, Zn на фоне подкисления SO_2) на

дождевых червей, сочетающий полевые исследования с лабораторными, включающий анализ сред обитания и накопления тяжёлых металлов в тканях люмбрицид. Впервые выявлена зависимость между расстоянием от точечного источника эмиссии, содержанием элементов в почве и количеством металлов в тканях *Perelia diplotetratheca* (Perel, 1967). Впервые установлено достоверное различие морфометрических показателей *Perelia diplotetratheca,* собранных на различном расстоянии от источника загрязнения. Выявлены разовое увеличение плодовитости люмбрицид под влиянием токсической нагрузки и изменение активности *P. diplotetratheca* и *Lumbricus rubellus* (Hoffmeister, 1843) в присутствии тяжелых металлов в почве и подстилке в условиях эксперимента.

Теоретическая и практическая значимость работы. Результаты проведенных исследований могут быть использованы в работах по экотоксикологии. Данные по динамике плодовитости дождевых червей в условиях токсической нагрузки и накоплению тяжелых металлов в тканях дождевых червей позволяют скорректировать модель токсического воздействия комплекса поллютантов на экосистемы (Безель и др., 1994; Воробейчик и др., 1994; Воробейчик, 2004). Данные об изменении морфометрических и популяционных показателей дождевых червей в условиях техногенного воздействия могут быть использованы для экологического нормирования токсических нагрузок.

В результате сравнительного анализа методик эвакуации содержимого пищеварительного тракта дождевых червей для экотоксикологических исследований выявлена наибольшая эффективность методики с использованием субстрата агар-агар. Материал диссертации может использоваться для создания экологических нормативов по установлению техногенной нагрузки на наземные экосистемы при использовании живых тест-объектов. Материалы по анализу методик очистки кишечника дождевых червей могут быть использованы в экотоксикологических исследованиях для пробоподготовки и в практическом курсе «Методы биоиндикации» для студентов обучающихся по специальности эколого-биологического профиля.

Методология и методы исследования. Методология настоящей диссертации основывается на стандартных и общепринятых схемах полевых и лабораторных исследований по изучению реакции дождевых червей на загрязнение окружающей среды выбросами медеплавильного производства.

На защиту выносятся следующие положения:

1. Комплекс поллютантов (тяжелых металлов и подкисления почв) влияет на число видов, численность, количество откладываемых коконов, размер и вес дождевых червей, определяет исчезновение отдельных морфо-экологических типов и групп.

2. Содержание тяжелых металлов (Cu, Zn, Cd, Pb) в тканях дождевых червей зависит от их количества в почве и подстилке, а также от токсичности тяжелых металлов и от половозрастного состояния люмбрицид.

Степень достоверности результатов исследования. Достоверность результатов настоящего исследования подтверждается репрезентативностью экспериментальных выборок, обеспечивается за счет применения современных аналитических методов измерения исследуемых параметров, корректного использования методик статистического анализа.

Апробация работы. Основные положения диссертации были доложены на конференции молодых ученых «Биосфера Земли: прошлое, настоящее и будущее» в г. Екатеринбурге в 2008 году; Международных научно-практических конференциях студентов и аспирантов в г. Новосибирске в 2009, 2010, 2011 годах; Международной научно-технической конференции «Студент и научно-технический прогресс», г. Омск, 2010; III Всероссийской студенческой научно-практической конференции с международным участием «Молодежь XXI века: образование, наука, инновации», г. Новосибирск, 2014; Международной пущинской школе-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века», г. Пущино, 2016; Региональная научно-практическая конференция молодых ученых «Биотехнологии в сельском хозяйстве, промышленности и медицине», г. Омск, 2017. На всех перечисленных мероприятиях автор работы принимал очное участие и выступал с докладами.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 7 работ, в том числе: 4 статьи в журналах, включенных в Перечень рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук, переводная версия одной из статей входит в международные базы цитирования (WoS, Scopus); 2 публикации в сборниках международных конференций и 1 публикация в сборнике всероссийской конференции.

Личный вклад автора. В процессе работы над диссертацией автор провел самостоятельное исследование в условиях стационара ИЭРиЖ УРО РАН. Работа включала сбор материала (дождевые черви, сборные пробы почв и подстилки) на различной удаленности от Среднеуральского медеплавильного завода, а так же изучение морфологических и биоценотических характеристик населения дождевых червей, обитающих в зоне токсической нагрузки. По оригинальной методике, разработанной автором, была осуществлена пробоподготовка дождевых червей к анализу на тяжелые металлы. В лабораторных условиях были проведены эксперименты с использованием трех видов дождевых червей.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 120 страницах, состоит из введения, четырех глав, заключения, списка использованных источников и литературы (254 наименования, из них 194 – на иностранных языках) и двух приложений. Диссертация содержит 32 рисунка и восемь таблиц (из них две таблицы – в приложениях).

Благодарности. За неоценимую помощь в работе и обучение автор искренне признателен своему научному руководителю, канд. биол. наук Е.В. Голованoвой. За большую помощь в проведении исследований, обсуждение результатов, ценные советы автор выражает благодарность д-ру биол. наук Е.Л. Воробейчику. Также автор признателен сотрудникам Института экологии растений и животных УРО РАН за помощь в подготовке к проведению полевых исследований и обсуждение результатов работы:

научному сотруднику М. Е. Гребенникову, канд. с.-х. наук И. Е. Бергману, канд. биол. наук А.И. Ермакову, канд. биол. наук Д.В. Нестерковой, канд. биол. наук А.В. Нестеркову. За обсуждение рукописи и ценные критические замечания автор признателен д-ру биол. наук М.В. Винарскому, д-ру биол. наук И.И. Богданову.

Работа выполнялась в рамках НИР по теме «Факториальная экология дождевых червей в условиях естественных и антропически измененных ландшафтов Урала и Западной Сибири » по проекту №1364 государственного задания на выполнение работ в сфере научной деятельности Министерства образования и науки РФ в 2014 году (Исполнитель). С 2014 по 2016 годы – переход на конкурсный проект №6.1957.2014/К государственного задания Министерства образования и науки РФ «Ключевые группы беспозвоночных животных фоновых и импактных территорий Западной Сибири и Урала» (Исполнитель). С 2016 по 2017 годы исследование выполнялось при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 16-34-00339 мол_а (Руководитель).

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Некоторые особенности экологии и биологии дождевых червей

Под дождевыми червями принято понимать крупных почвенных малощетинковых червей (*Oligochaeta*), относящихся к типу кольчецов (*Annelides*). По данным Т.С. Всеволодовой-Перель (1997), фауна дождевых червей Российской Федерации представлена, в основном, семейством настоящие дождевые черви (*Lumbricidae*), включающая 56 видов и 5 подвидов. На территории Урала обитают 12 видов люмбрицид, которые в условиях невозделываемых территорий представлены преимущественно видами-эндемиками (Перель, 1979, 1997).

Несмотря на разнообразие дождевых червей, они обладают рядом общих черт (Pavlíček, Hadid, 2013). Тело дождевых червей имеет вытянутую форму длиной от нескольких сантиметров до нескольких десятков сантиметров, в зависимости от вида, состоит из сегментов (до 450). На первом сегменте находится ротовое отверстие (перистомиум), над которым располагается головная лопасть (простомиум). Первый сегмент лишен щетинок, на последующих сегментах имеется по 8 щетинок, расположенных одиночно, образуя по 8 продольных рядов, или парами по 4 ряда. Большинство видов имеет серую окраску, нередко присутствует пигментация, окраска меняется от пурпурной до бурой, редко в присутствии меланина может быть коричневой. Присутствие красного пигмента делает тело люмбрицид невосприимчивыми к воздействию ультрафиолетовых лучей (Edwards et al., 1998). Сквозь покровы может просвечивать полостная жидкость, которая имеет яркую желтую окраску (Перель, 1979). Иногда из-за присутствия меланина черви бывают практически черного цвета.

Дыхание червей происходит при помощи всего тела, поглощение кислорода и выведение углекислого газа осуществляется через его покровы. Затем кислород поступает в сильно разветвленные капилляры кровеносных

сосудов в стенки тела, где при помощи дыхательных структурных элементов крови транспортируется к внутренним органам. Дождевые черви могут на протяжении значительных отрезков времени выживать в воде, если уровень растворенного кислорода достаточно высок (Edwards et al., 1998).

Кожные железы выделяют слизь, для предотвращения высыхания и облегчения передвижения в почве (Балуев, 1950).

Люмбрициды не могут поддерживать стабильную температуру тела, при понижении температуры окружающей среды снижается скорость метаболических реакций, и, наоборот, увеличение температуры увеличивает скорость метаболических процессов (Колеватова, 1983).

Выведение продуктов метаболизма осуществляется через нефридии, которые по функциям подобны почкам (Догель, 1981).

Кровеносная система замкнутого типа (кровь не смешивается с полостной жидкостью), представлена спинным и брюшным кровеносными сосудами, которые посегментарно соединены кольцевыми сосудами (Pavlíček, 2014). Циркуляция крови происходит при помощи сокращения утолщенных сосудов – «сердец» (Догель, 1981).

Нервная система состоит из брюшной нервной цепочки, которая расширяется в головном сегменте. Нервная цепочка контролирует, главным образом, сокращение и расслабление мышц. Как таковых органов чувств не обнаружено, кроме имеющихся на поверхности тела рецепторов, отвечающих за восприятие освещенности, кислотности, влажности, химических веществ. Также у ротовой лопасти имеются вкусовые рецепторы. Экспериментально доказано, что в лабораторных условиях некоторые виды предпочитают морковные листья, взамен сельдерейных и капустных (Sherman, 2001), в условиях делянок яблочный жмых более предпочтителен, чем другие виды жмыха, для вермикомпостирования (Hanc, Chadimova, 2014). В полевых условиях обнаружено статистически достоверное различие в предпочтении опада местной растительности по сравнению с интродуцированной видом Lumbricus terrestris (Rajapaksha et al., 2013).

Пищеварительная система состоит из ротового отверстия, за которым следует глотка, далее следует пищевод. Пищевод переходит в зоб, располагающийся в 15–16 сегменте, за которым следует интерстициальный мускулистый желудок, находящийся между 17 и 19 сегментами. В мускулистом желудке происходит перетирание пищи благодаря содержанию крупных неорганических включений (Стриганова, 1975). Существует прямая связь между типом питания и строением пищеварительной системы, что дает основание относить люмбрицид к разным экологическим группам, связанным с типом питания (Семёнова, 1966, 1969). Дождевые черви, которые питаются собственно органическими остатками почвы, имеют сильно развитый тифлозоль – впячивание средней кишки. Наличие тифлозоля увеличивает поверхность всасывающего эпителия. Черви, которые обитают на поверхности и питаются перегноем, имеют невыраженный тифлозоль. Промежуточное положение занимает тифлозоль у люмбрицид, питающихся неразложившимися растительными остатками. Клаус с соавт. (2014) отмечает варицию копролитов дождевых червей, которая зависит не только от видоспецифичности, но и от реакции организма на условия среды.

Примерно с 19-20 сегмента и далее у люмбрицид имеется поясок, который представляет собой железистое утолщение покровов впередиидущих сегментов и имеет или кольцевидную, или седловидную форму (Всеволодова-Перель, 1997).

Дождевые черви являются гермафродитами. Гаметогенез мужских и женских половых клеток является синхронным, проходит с весны и до конца лета, данный период соответствует периоду размножения (Dunger, 1964; Satchell, 1967; Lee, 1985). Мужская половая система представлена семенными пузырьками, расположенными, как правило, с 9-го по 12-й сегмент и мужскими семявыводящими воронками, попарно расположенными в 10-м и 11-м сегментах.

Сперматеки содержат сперматозоиды в течение всего года, при этом наблюдаются два пика продуктивности половых клеток: первый приходится на весенний период, второй наблюдается осенью (Garvin et al., 2003).

Женская половая система обычно включает одну пару яичников, располагающихся в 13-м сегменте, за которыми следуют яйцевые мешки (расположенные в 14-м сегменте) и маточные трубы. Период половозрелости связан с образованием пояска размножения (tubercula pubertatis), который образуется в течение 12 месяцев (Jamieson, 2002). На данном пояске находятся половые сосочки, которые являются модификацией половых щетинок и используются для обмена половыми клетками между копулирущими партнерами.

Как правило, спаривание длится от 69 до 200 мин (Michiels, 1998). Длительность спаривания зависит от экологического типа червей по отношению к определенному вертикальному слою. Виды, которые обитают в подстилке, копулируют быстрее, чем почвенные и норные виды, из-за риска быть съеденными хищниками, поскольку в данном состоянии люмбрициды практически обездвижены. Выбор партнеров для копуляции также зависит от размеров особей: как правило, люмбрициды выбирают равных себе по размерам особей (Michiels et al., 2001). Частным случаем являются эпигейные (обитающие в верхних слоях почвы) виды, которые выбирают партнера меньшего размера, с целью снижения риска быть обнаруженным хищником (Michiels 1998). Сам процесс оплодотворения происходит не во время копуляции, а после откладки коконов. Функция коконов, как правило, заключается в перенесении неблагоприятных условий, они могут находиться в жизнеспособном состоянии до 2-3 лет. Как правило, откладка коконов происходит в увлажненных почвах, чаще всего – в верхних слоях и подстилке (Lee, 1985). Забота о потомстве для червей не характерна, исключение составляют роды Pontoscolex и Balanteodrilus, которые строят камеру для откладки кокона (как правило, только одного) и периодически ее очищают (Ceballos, Fragoso, 2006).

Время от начала оплодотворения до появления ювенильных особей из кокона составляет около 14-21 дней (Leverack, 1963).

Развитие дождевых червей прямое. Оплодотворение происходит в коконе, из которого выходит одна и более ювенильных особей. Существует закономерность, которая связана с размером дождевых червей и численностью ювенильных особей выходящих из кокона: чем крупнее особь, тем больше ювенильных особей выйдет из кокона (Tato et al., 2006).

А. Г. Викторов (1993) отмечал, что на территории России соотношение полиплоидных и диплоидных видов составляет 46:52. Причем отмечено, что полиплоиды, как правило, занимают определенные территории распространения. Полиплоидия и партеногенез приводят к высокому уровню гетерозиготности, что обеспечивает устойчивость дождевых червей к окружающей среде (Edwards, Bohlen, 1996).

Люмбрициды обитают исключительно под землей, причем, как правило, в почвах с широким химическим спектром. Дождевые черви имеют широкий ареал распространения: хвойные и лиственные леса, перелески, заливные луга и пашни (Lee, 1985).

На червей, как и на остальных представителей мезофауны, действуют абиотические факторы, которые определяют среду обитания (климатические условия, тип и химизм почв). К биотическим факторам можно отнести конкуренцию, хищничество, паразитизм и болезни люмбрицид (Edwards, Bohlen, 1996). Климатические условия влияют косвенно, посредством воздействия на среду их обитания и питания, а также напрямую.

Температурный интервал, в рамках которого большинство червей может функционировать, довольно узок, с верхним значением летальности от 25°C до 35°C. Оптимум температур для холодостойких видов и видов, обитающих в умеренных широтах, находится в диапазоне от 10°C до 20°C, для обитателей тропических и субтропических широт – от 20°C до 30°C (Edwards, Bohlen, 1996). Некоторые виды, обитающие в условиях резкоконтинентального климата, имеют поведенческие и физиологические приспособления,

позволяющие им выдерживать температуры ниже 0°С (Берман и др., 2002). Температура также определяет состав и структуру сообществ люмбрицид, которые питаются непосредственно на поверхности почвы и перегноем. Поскольку при повышении температуры процесс разложения органического вещества происходит гораздо интенсивнее, популяции в тропиках, как правило, более малочисленны, чем в умеренных широтах (Lavelle et al., 1997). С повышением температуры почвенные виды, питающиеся на поверхности, используют пищу, которая находится непосредственно в почве, при помощи мутуалистических взаимоотношений с микроорганизмами, способствующими пищеварению. Микрофлора почвы повышает доступность питательных веществ для червей (Petersen, Luxton, 1982). Это особенно необходимо в условиях подстилки с низким содержанием органических веществ, – например, в тропических почвах (Lavelle et al., 1992). Также увеличение температуры косвенно влияет на люмбрицид, уменьшая количество влаги, находящейся в почве. Именно этот фактор многие авторы описывают как основную причину гибели на фоне теплового стресса в умеренных широтах; наибольшему влиянию подвержены ювенильные особи (Phillipson et al. 1976; Edwards , Bohlen, 1996; Lee, Kim, 2008). Наоборот, обильное количество осадков, как правило, повышает численность дождевых червей. Оптимальная влажность почвы является видоспецифичной и определяется экологическими особенностями люмбрицид. Данный показатель может различаться в пределах вида и обуславливаться приспособлением к условиям окружающей среды. Дождевые черви наиболее активны при матричном давлении почвенной влаги 10 кПа (Baker, Chensin, 1975).

Кроме влажности на люмбрицид влияют такие характеристики почвы, как ее структура, pH и содержание органического вещества. Дождевые черви, как правило, отсутствуют в очень кислых почвах (pH менее 3,5), при снижении значения pH менее 4,5 постепенно происходит сокращение численности популяции. Большинство видов люмбрицид, обитающих в умеренных климатических широтах, существует в пределах pH от 5,0 до 7,4 (Lavelle, 1988).

При этом люмбрициды способны нейтрализовать действие кислотных почв известкованием при помощи известковых желез (Bouche, 1972; Xing et al., 2012; Сорокин и др., 2013). Известковые железы, в которых находится суспензия карбоната кальция, являются железистыми парными органами и у большинства видов располагаются в 10-14 сегментах (Gago Duport et al., 2008). Протоки желез впадают попарно в передние отделы кишечника: первый проток – в 10-м сегменте, второй – в 14-м. Активность данных желез видоспецифична: у рода *Octalasion* она является менее выраженной, чем у рода *Lumbricus,* следовательно, и менее продуктивной. Соответственно, можно сделать вывод, что род *Lumbricus* является более толерантным к закислению почв. Тем не менее, лабораторные исследования М. Буше (Bouche, 1972) выявили видоспецифичность рода *Octalasion*. Так, например, по классификации Д. Сетчела (Satchell, 1967) *Octalasion tyrtaeum* (Savigny, 1826) является нетолерантным к pH, а *Octalasion cyaneum* (Savigny, 1826) оказался кислотолюбивым видом. Морфология известковых желез в семействе *Lumbricidae* показывает большую изменчивость как в анатомическом плане, так и в плане секреторной активности. Р.В. Симс и Б.М. Жерар (1985) связывают это с местом обитания и различием в кормовой базе. Например, дождевые черви, которые обитают кислых средах (торфяниках, хвойных лесах) и питаются органикой, не подвергшейся разложению, как правило, имеют более сложные железы и производят большие объемы известковой жидкости. Кроме того, на деятельность известковых желез прямое влияние оказывают изменения в условиях окружающей среды и фазы активности (например, диапауза). Из других факторов, относящихся к неорганической природе почвы, на распределение червей в субстрате отрицательно влияет увеличение содержания кальция (Ca^{2+}) и магния (Mg^{2+}), (Bouche, 1972).

Для большинства видов червей наиболее благоприятными являются средние по механическому составу почвы, в сравнении с песчаными почвами или почвами с повышенным содержанием глины (Hendrix, Bohlen, 2002). Так, опыты с *Aporrectodea caliginosa* (Savigny, 1826), *Aporrectodea rosea* (Savigny,

1826), *Lumbricus terrestris* (Linnaeus, 1758) показали, что уменьшение плотности популяции прямо пропорционально увеличению пропорции песка и глины (Lavelle, Martin, 1992). Авторы отмечают, что чаще всего влияние структуры почвы носит косвенный характер через особенности влагозадержания. Тяжелые, плохо дренированные глинистые почвы после проливных дождей, содержат много влаги, но низкое количество кислорода, и, наоборот, легкие песчаные почвы богаты кислородом, но подвержены засухам из-за быстрой потери влаги.

Мощность почвенного горизонта является важным фактором вертикального распределения люмбрицид. Серые лесные почвы из-за малой мощности располагаются на подстилающих породах с малым количеством кислорода, следовательно, данный тип почв является ограничивающим фактором для норных видов (Cotton, Curry, 1980).

Некоторые виды дождевых червей могут находиться в переувлажненной почве и даже в условиях затопления (Четыркина, 1930; Edwards, Brown,1982). У некоторых из них жизненный цикл связан с водной средой, такие виды люмбрицид называются амфибиотическими (Перель, 1977, 1977б). Данные виды червей становятся половозрелыми только в затопленных водой почвах (Zicsi, 1979, 1981), и откладка коконов происходит в почвы с избыточным увлажнением. Питание амфибиотических видов также осуществляется под водой, либо перегноем почвы, либо растительными остатками, которые скапливаются на дне водоема. Как отмечено авторами (Pop, 1941; Bouche, 1972), несмотря на то, что большую часть своего жизненного цикла виды-амфибионты проводят под водой и в условиях переувлажнения, непродолжительное время они могут существовать и в засушливых условиях. Причем, если данный период затягивается, у некоторых видов отмечается способность впадать в диапаузу, зарываясь в грунт на глубину до 1 метра. Отличительными особенностями амфибиотических видов является расширение в области хвостового конца тела, с помощью колебательных движений

которого особь может перемещаться в толще воды и облегчать газообмен, как у трубочников – типичных водных олигохет (Перель, 1958; Bouche, 1972).

Существенное значение оказывает пищевой фактор, а именно компоненты, его определяющие: помет животных, травянистые растения, деревья и кустарники. Наиболее показателен коэффициент отношения углерода к азоту. Для большинства видов люмбрицид оптимальным является почвенный показатель, составляющий 20 частей углерода к 1 части азота. Границы, в которых могут существовать различные виды в обедненных органикой почвах (как правило, кислых), доходят до соотношения 60 частей углерода к 1 азота. Существует ряд экспериментов, в ходе которых, после внесения на поля органических удобрений увеличивалась численность *Aporrectodea caliginosa* в 2,7 раза. При этом указывается, что численность данного вида может повышаться самопроизвольно, – например, на постоянных пастбищах крупного рогатого скота (Lowe, Butt, 2005). Тем не менее, повышение биомассы червей в естественных условиях без человеческой деятельности маловероятно (Rida, 1997). Некоторые виды дождевых червей, например, из рода *Allolobophora* и *Dendrobaena*, находятся в тесной трофической связи с ризоидами корневой системы деревьев. Следовательно, ограничивающим фактором для них будет являться обезлесение территории. Из-за разнообразия кормовой базы общим индикатором качества пищи может служить содержание азота (Lee, 1985; Carnol, Bazgir, 2013). При этом, данный показатель не является фактором, влияющим на рост и развитие червей (Versteegh et al., 2014). Так, при внесении азота от 1 до 5 % (в виде *овсяницы луговой*) на поля, где культивировался вид *A. caliginosa*, темпы роста были значительно ниже, чем при внесении азота в пределах 2% виде *люцерны посевной*. Для подстилочных видов, в отличие от почвенных, важным фактором оказался размер частиц растительного сырья, вносимого в качестве подкормки (Lofs-Holmin, 1986). Оптимальным оказался вариант измельчения растительного сырья меньше 5 мм с добавлением размолотой (меньше 1 мм) торфо-минеральной смеси (Satchell, 1967; Manh, Wang, 2014). В дальнейшем обнаружена большая эффективность

вермикомпоста с первоначальной торфяной смесью (Mendoza Hernández et al., 2014). Как правило, черви не питаются свежими растениями. Так, опыты с *A. caliginosa* показывают, что кормление люмбрицид свежей люцерной приводит к высокой смертности вида, поскольку в ней содержатся разного рода сапонины (Wright,Stringer, 1980; Lofs-Holmin, 1986).

Для изучения популяционных характеристик в первую очередь необходимо выделить морфо-экологические типы дождевых червей. Люмбрициды характеризуются с позиции питания (по Перель, 1979). Поскольку все люмбрициды являются сапрофагами, отличия заключаются в характере используемой растительной пищи. К первому морфо-экологическому типу по питанию относятся «первичные гумусообразователи», которые могут питаться не только слаборазложившимися растительными остатками, но и живыми частями травянистых растений. Следовательно, имеется сочетание сапрофагии с фитофагией. Такие виды, как правило, характеризуются более медленным передвижением в субстрате. Ко второму морфо-экологическому типу по питанию относятся «вторичные гумусообразователи», которые питаются перегноем – в значительной степени субстрат, подвергшийся деструкции (Dunger, 1964). Такие виды люмбрицид характеризуются большей активностью передвижения в субстрате. К промежуточному морфо-экологическому типу по питанию можно отнести виды, которые заглатывают почву с находящимися в ней мелкодисперсными органическими веществами. Вышеописанные морфо-экологические типы на анатомо-физиологическом уровне будут отличаться развитием тифлозоля – продольного желобообразного впячивания дорсальной стенки кишечника в полость средней кишки (Семенова, 1966). Чем ниже процент потребляемой органической составляющей, тем меньше площадь всасывающей поверхности, и наоборот (Bouche, 1972).

Наиболее информативной является классификация, предполагающая разделение люмбрицид на морфо-экологические типы в зависимости от вертикального распределения в субстрате, а именно: в почве – почвенные виды, только в подстилке – подстилочные виды, в почве и подстилке – почвенно-

подстилочные виды, в глубоких слоях почвы – норники. Собственно почвенные формы по В.К. Балуеву (1950) делятся на 3 группы:

1. верхнеярусные виды, которые постоянно обитают в гумусовом горизонте (*Lumbricus castaneus* (Savigny, 1826));
2. среднеярусные виды, которые проживают на глубине до 40-60 см только при неблагоприятных условиях (*P. diplotetratheca*);
3. нижнеярусные виды, обитающие постоянно на глубине до 1-1,5 м и глубже (*Lumbricus terrestris*).

Наличие мощной подстилки и практически полное отсутствие гумусового (маломощного) слоя является лимитирующим фактором для червей-норников и люмбрицид, которые относятся ко «вторичным гумусообразователям» и питаются детритом, находящимся собственно в почве.

Вне зависимости от морфо-экологического типа дождевых червей, для них характерна сезонная активность, а также активность, связанная с перенесением неблагоприятных условий. При засухе и в осенний период при понижении температуры, люмбрициды мигрируют на глубину до 1 м, где сворачиваются в клубочки в почве или внутри построенных из собственных копролитов капсул, и впадают в диапаузу. С диапаузой связаны физиологические изменения: накопление гликогена в хлорагагенной ткани (Семенова, 1967), а так же увеличение уровня гемоглобина в крови (Byzova, 1974). Как отмечает ряд авторов, способность впадать в диапаузу характерна для почвенных и почвенно-подстилочных видов, питающихся собственно перегноем почвы (Соколов, 1956; Balzer, 1956; Роднянская, 1957). В данной группе имеются исключения: вид O. tyrtaeum (O. lacteum) плохо переносит неблагоприятные условия, связанные с понижением температуры и высыханием почвы, черви не инкапсулируются и медленнее остальных видов впадают в диапаузу (Роднянская, 1957; Перель, 1979). Зато отмечено, что *O. tyrtaeum* лучше других видов переносит переувлажнение почвы, поскольку имеет густую сеть кровеносных сосудов и повышенное содержание гемоглобина в крови, что

повышает выживаемость особей при плохой аэрации субстрата (Семенова, 1968; Buzova, 1974).

У видов, которые питаются на поверхности почвы, такой способности нет: как правило, при наступлении неблагоприятных условий они закрывают норные ходы и снижают уровень активности, но при этом не окружают себя капсулой из копролитов (Соколов, 1956).

1.2. Влияние выбросов металлургической промышленности на население дождевых червей

К почвенной мезофауне по классификации М.С. Гилярова (1978) относят крупных (от нескольких миллиметров до нескольких сантиметров) животных, которых можно учесть с помощью ручной выборки. По классификации Дэнгера (1964) дождевые черви относятя к макрофауне – животным, для которых почва является плотной средой, оказывающей значительное механическое сопротивление при движении.

Техногенное загрязнение, как правило, является негативным фактором для почвенных организмов. Основными направлениями изменений при загрязнении тяжелыми металлами являются: снижение численности населения почвенной мезофауны, как следствие – уменьшение общей скорости деструкции органического вещества в экосистеме. Параллельно этому процессу происходит снижение таксономического разнообразия мезофауны и изменение структуры доминирования, что в общем счете приводит к модификации трофической структуры населения почвенной мезофауны в сторону уменьшения доли сапрофагов и увеличения доли фитофагов, а также увеличения пространственной неоднородности и изменения вертикальной стратификации населения (Безель, 2006). Такие же общие закономерности отмечены и у дождевых червей, находящихся в зоне действия точечного источника эмиссии. Под точечным источником эмиссии многие авторы рассматривают металлодобывающие, металлоперерабатывающие и химические

предприятия (Криволуцкий, 1984; Бессолицына, 1987; Богач с соавт., 1988; Воробейчик, 1991; Большаков с соавт., 2001; Langdon et al., 2005; Nannoni et al., 2011b и др.).

Многие исследователи отмечают лидирующую роль дождевых червей в качестве ключевых индикаторов состояния экосистем. В основном, это относится к индикации загрязнения тяжелыми металлами. В условиях эксперимента было показано, что металлы являются причиной гибели (Fitzpatrick et al., 1996; Neuhauseretal., 1985; Spurgeon, Hopkin, 1995; Spurgeon et al., 2005, 2006), причиной снижения активности размножения (Cikutovic et al.,1993; Siekierska, Urbanska-Jasik, 2002), причиной снижения выхода ювенильных особей из коконов (Ma, 1988; Spurgeon, Hopkin, 1995; Spurgeon et al., 2005), причиной снижения выживаемости ювенильных особей (Spurgeon, Hopkin, 1995; Van Straalen et al., 2001, 2005) и причиной угнетения роста люмбрицид (Khalil et al., 1996). Наиболее важным и лимитирующим фактором является наличие свободных ионов тяжелых металлов, а не общее содержание металлов в почвах (Giovanetti et al., 2010; Nannoni et al., 2011a). В основе большинства работ по изучению влияния тяжелых металлов на дождевых червей авторы отвечают на следующие вопросы: носит ли реакция дождевых червей на различные поллютанты видоспецифичный характер или она у всех представителей люмбрицид одинакова; какие типы почв и формы металлов должны быть использованы, если исследования имеют лабораторный характер; сколько необходимо времени для нахождения люмбрицид в токсичной среде, чтобы достичь устойчивой реакции; каким образом необходимо проводить пробоподготовку дождевых червей; какие параметры почвы должны быть использованы для прогнозирования накопления поллютантов люмбрицидами (Lanno et al., 2004; Van Gestel, 2008; Owojori et al., 2009; Neaman et al., 2012; Chaudhuri et. al., 2014 и др.)

Как в лабораторных, так и полевых исследованиях, поллютанты вносят значительные изменения в популяционные показатели дождевых червей, такие как видовой состав, численность, возрастной состав, вертикальная

стратификация, плодовитость (Криволуцкий, 1985; Некрасова, 1993; Воробейчик с соавт., 1994 и др.). Авторами отмечено, что количество люмбрицид зависит от расстояния до источника эмиссии. Как правило, фоновые территории характеризуются типичной численностью особей для данного типа местности, на буферной территории начинается снижение численности, а иногда и полное отсутствие из-за мозаичности расположения поллютантов (Воробейчик, 1998; Agbaire et. al., 2012). При уменьшении расстояния до источника эмиссии на импактной территории, как правило, наблюдается полная элиминация данного семейства. Существуют исключения, которые связаны, в первую очередь, со снижением токсической нагрузки вследствие отсутствия одного из факторов, повышающих токсическое действие поллютантов. В большинстве случаев таким фактором является понижение кислотности почв из-за уменьшения выбросов серо- и азотосодержащих газов, которые вместе с осадками проникают в грунт. Так, при отсутствии подкисляющих агентов люмбрициды обнаруживались на расстоянии менее 1 км от завода (Bengtsson et al., 1983, 1985). Также численность дождевых червей на расстоянии 5-7 км от Среднеуральского медеплавильного завода практически равняется численности на фоновой территории, при этом отмечено, что данные территории содержат высокие концентрации тяжелых металлов. И только при значительном подкислении почвы и подстилки (с 6,2 до 4,7), на расстоянии 4 км от завода, и 3,8 км от Красноуральского медеплавильного завода, черви обнаружены не были (Воробейчик, 1998). На территории Мечегорского металлургического завода из-за повышенного количества выбросов подкисляющих газов исчезновение люмбрицид наблюдалось на расстоянии 21 км от завода (Степанов с соавт., 1991).

Таким образом, в вышеприведенных случаях имеет место эффект синергизма между понижением pH и подвижностью тяжелых металлов в почве, при котором увеличивается их накопление в тканях люмбрицид, что приводит к массовой гибели (Ma, 1982, 1988; Ma et al., 1983; Vig et al., 2011). Результаты, полученные в полевых условиях, подкрепляются экспериментальными

данными, согласно которым ущерб (смертность половозрелых и ювенильных особей, снижение плодовитости), полученный от тяжелых металлов (Pb, Zn, Cu, Cd), увеличивается при искусственном понижении pH среды (Bengtsson et al., 1986; Honeycutt et al., 1995). Нами было встречено одно исследование, в котором отмечено угнетение популяционных характеристик люмбрицид при pH в границах 6,5-7,0 (Wrigt, Stringer, 1980).

Наиболее распространенным видом, используемым в лабораторных токсикологических экспериментах, является вид *Eisenia fetida*, благодаря своей живучести и легкому содержанию в лабораторных условиях, маленькому периоду созревания (55 суток), высоким темпам размножения, и главное – широкому спектру адсорбции токсикантов (Fitzpatrick et al., 1996; Spurgeon et al., 2000; Li et al., 2010; Zhou et al., 2013). Кроме того, *E. fetida* является коммерческим видом, который доступен в любое время года в неограниченных количествах (Pramanik et al., 2011; Garg et al., 2011; Singh et al., 2013). Тем не менее, выбор *E. fetida* подвергался критике, так как он не является типичным представителем природной экосистемы, а населяет органически богатые места обитания, например, компост и навозные кучи (Bouche, 1972). Кроме того, по данным некоторых авторов, *E. fetida* менее чувствителен к загрязнению окружающей среды, чем другие виды (Langdon et al., 1999, 2003; Bernard et al., 2010; Yadav et al., 2011). По всем остальным видам, кроме вышеописанного, нами обнаружено ограниченное число исследований, которые проводились с прогнозированием влияния тяжелых металлов на червей и указывали на сравнительно небольшой разброс в межвидовой динамике. При этом акцент смещен в сторону модельных видов дождевых червей, которые служат, как правило, для прогнозирования биоаккумуляции тяжелых металлов. Несмотря на все недостатки, выбор вида *E. fetida* в качестве токсикологического стандарта будет сохраняться по вышеописанным его характеристикам в лабораторных экспериментах. Кроме общего теста на острую токсичность и плодовитость на данном виде, наряду с *Lumbricus rubellus* и *Aporrectodea caliginosa*, изучалась кинетика поглощения тяжелых

металлов люмбрицидами (Morgan, Morgan, 1988, 1998b, 1992, 1993). В полевых условиях реакция дождевых червей на действие поллютантов изучалась на видах, характерных для данных типов местности: *L. rubellus, L. terrestris, Allolobophora chlorotica, Al. tuberculata, Aporrectodea caliginosa, A. rosea, A. longa, Dendrodrilus rubidus* (Morgan, Morgan, 1993; Marino, Morgan, 1999b; Marinussen, van der Zee, 1996, 1997; Maboeta et al., 1998, 1999).

За основные поллютанты в данном случае исследователи принимают растворимые формы тяжелых металлов, которые могут переходить в ионизированную форму (Pb, Cu, Zn, Cd) и увеличивать свою активность при понижении pH почвы и подстилки (Дончева, 1992; Чёртов с соавт., 1990; Spurgeon, Hopkin, 1996; Singh et al., 2012 и др.). На уровень pH также будут влиять выбросы заводов, в основном – соединения серы (SO_2) (Воробейчик с соавт., 1994). Причем, если исключить общее подкисление, эффект воздействия тяжелых металлов на люмбрицид будет меньше (Bouche, 1972; Оливериусова, 1983; Елпатьевский, 1988).

Вместо численности любмрицид некоторые авторы используют показатель биомассы дождевых червей (Bengtsson et al., 1985; Степанова, 1982). Здесь наблюдается ожидаемый результат, так же как и с численностью: с уменьшением расстояния до источника эмиссии снижается биомасса червей.

Как отмечает Е. Л. Воробейчик (1998, 2007), в районе действия Среднеуральского медеплавильного завода не было обнаружено видоспецифической реакции дождевых червей на загрязнения. Автором отмечаются лишь наиболее чувствительные виды, которые исчезают в первую очередь при увеличении токсической нагрузки. При приближении к источнику эмиссии в первую очередь исчезает вид *A. rosea*, так же, как и на территории Красноуральского медеплавильного завода. Остаются только почвенно-подстилочные виды, которые являются доминантами – *Eisenia atlavinyteae* и *P. diplotetratheca* (Воробейчик, 1995, 1998; Воробейчик с соавт., 2007). Отсутствие видоспецифической реакции на загрязнение отмечается в зоне действия металлообрабатывающих комплексов Европы (Wrigt , Stringer, 1980).

Другими авторами наблюдается видоспецифическая реакция червей на присутствие поллютантов в почве, на которую косвенно влияет характер питания: чем ближе к источнику эмиссии, тем больше процент эпигейных видов (Edwards, Brown, 1982).

В естественных условиях отсутствуют закономерности в возрастной структуре поопуляции, в лабораторных опытах наблюдается снижение количества неполовозрелых особей (Hartenstein et al., 1980; Beyer et al., 1987). Данный эффект, в первую очередь, может быть связан с неприспособленностью ювенильных особей к условиям химического загрязнения (Malecki et al., 1982; Bengtsson et al., 1985).

Исследователями на загрязненных территориях отмечается уменьшение продуктивности люмбрицид и замедление физиологических процессов (регенерации тканей) (Bengtsson et al.,1985; Potthoff et al., 2008).

В вертикальном распределении червей в субстрате авторами отмечено два варианта. По данным Е. Л. Воробейчика (1998), при уменьшении расстояния до источника эмиссии наблюдается сдвиг люмбрицид в верхние слои горизонта (подстилку), по мнению автора это связано с отсутствием достаточного количества кислорода для жизнедеятельности. Наиболее характерным вариантом является отсутствие червей в верхних горизонтах, поскольку, как правило, там содержатся максимальные концентрации поллютантов (Королева, 1985).

Отдельно проводилось исследование реакции дождевых червей как целостного семейства на концентрацию тяжелых металлов и стороннее подкисление, связанное, например, с условиями подстилающих пород (Bonneau, 2005; van der Heijden et al., 2011). Многие авторы отмечают неблагоприятное воздействие на почвенную биоту в результате подкисления почв (Godbold, Huttermann, 1994). На фоне общего снижения количества видов обилие почвенных беспозвоночных будет увеличиваться в пользу ацидофильных организмов (Kuperman, 1996). Большинство червей отсутствует в очень кислых почвах, особенно эндогейные виды, в отличие от эпигейных,

которые являются более терпимыми к низким значениям pH (Graefe, Beylich, 2003; Huhta, 2004). Эпигейные виды являются более терпимыми к значениям pH от 4 до 7,5, тем самым могут распространяться на более обширных территориях (Palm et al., 2013).

Наряду с увеличением тяжелых металлов, при увеличении кислотности в почве увеличивается концентрация свободного аллюминия, который угнетает адсорбцию кальция, играющего важную роль во многих важных биологических процессах дождевых червей, например, участвует в передаче импульсов в нервных волокнах, а так же деятельности известковых желез (Opper et al., 2010; Lambkin et al., 2011).

Многими учеными отмечено, что черви, в свою очередь, оказывают воздействие на почвы, находящиеся вблизи металлоперерабатывающих заводов (Wilcox et al., 2002; Shipitalo, Le Bayon, 2004 и др.).

Черви повышают уровень pH, тем самым увеличивая ресурс питания деревьев и восстанавливая нарушенную продуктивность лесов (Deleporte и Tillier, 1999; Potthoff и др., 2008). Наличие хеморецепторов вдоль тела делает червей очень чувствительными к химическим веществам в окружающей среде, а способность к мобильности позволяет им избежать неблагоприятной среды (Udovic, Lestan, 2010). Таким образом, наблюдение за реакцией дождевых червей позволяет считать их перспективными объектами изучения экологической безопасности естественных ландшафтов (Markert et al., 2003; Reinecke, Reinecke, 2004; Loureiro et al., 2005).

1.3. Накопление тяжелых металлов в тканях дождевых червей

Черви являются важным звеном в процессе передачи тяжелых металлов от растений к животным, которые питаются ими (Reinecke, 1999). Авторы отмечают, что под биодоступностью следует понимать степень, при которой загрязняющее вещество, находящееся в почве, может беспрепятственно аккумулироваться в тканях организма (Bouche, 1992; Ma et al.,1993;

Lourenco et al., 2012). Для изучения биоаккумуляции, как правило, используются половозрелые здоровые организмы, без видимых повреждений (Palzenberger et al., 1995).

Один из основных путей попадания тяжелых металлов в организм дождевых червей связан с поглощением воды и растворенных в ней веществ через кожные покровы (Belfroid et al., 1995). Значительный вклад в накопление поллютантов вносит поглощение органических веществ, – следовательно, адсорбция осуществляется через желудочно-кишечный тракт (Jager et al., 2003). Прежде, чем соединения тяжелых металлов попадают в организм люмбрицид, происходит взаимодействие между ионами металла и лигандами частиц, находящихся в почвенном растворе, чаще всего гуминовых кислот (Kang et al., 2011; Hait et al., 2012). Идеальная модель катионного обмена описана на глинистых минеральных почвах с обменом алюминия (Al) и железа (Fe) в их оксидах на катионы тяжелых металлов при участии органических кислот с учетом буферности почв (Tipping, 1994; Black et al., 2011). Как указывают некоторые авторы, токсичность почв и реакции с участием тяжелых металлов носят видоспецифичный характер (Peijnenburg, 1999; Santore et al., 2001; Di Toro et al., 2001).

Биологическая роль накопления тяжелых металлов в тканях люмбрицид заключается в последствиях воздействия на индукцию внутриклеточных систем, которые зачастую приводят к различным нарушениям процессов жизнедеятельности (Spurgeon et al., 1996). Детально изучена общая схема детоксикации металлов, которую можно обнаружить, наблюдая за изменением экспрессии гена, кодирующего металлсвязывающий белковый комплекс металлотионеин-2 (МТ-2) (Spurgeon et al., 2005). Также существует исследование, утверждающее, что нарушение синтеза данных комплексов связано с сильным повреждением ДНК люмбрицид (Lourenco et al., 2011). Как правило, токсичность оценивается на организменном уровне, путем измерения выживания и репродуктивной функции. Наличие тяжелых металлов можно установить биохимическим методом, присутствие аргинина и лизина и

отсутствие глутаминовой кислоты можно рассматривать как маркеры загрязняющих веществ в окружающей среде (Aja et al., 2014).

Для изучения кинетики накопления тяжелых металлов в разных органах и тканях животных применялся метод фракционирования, основанный на разделении тканей и органов при помощи препаровальных инструментов под бинокуляром (Honeycutt et al., 1995; Conder et al., 2002). Для установления концентрации поллютантов в эпидермисе люмбрицид представляется возможным использовать образцы, зафиксированные в 4%-ном растворе формалина или спирта с добавлением глицерина (Spurgeon, Hopkin, 2000; Vijver et al., 2003). Или же непосредственно приступать к пробоподготовке с еще живыми обьектами (Arnold et al., 2003; Steenbergen et al., 2005). Также наиболее простым методом являлся метод предварительной сушки люмбрицид на фильтровальной бумаге. При этом, проходит процесс дефекации – освобождения пищеварительного тракта от его содержимого (копролитов), поскольку оно вносит дополнительные значения при измерении концентрации тяжелых металлов (Neuhauser et al., 1984,1995; Spurgeon, Hopkin, 2000).

Наряду с выбором видов дождевых червей и методик пробоподготовки, немаловажным остается вопрос выбора субстрата для исследований. Многие авторы придерживаются мнения, что субстрат для использования в опытах должен быть стандартизирован (Spurgeon, Hopkin, 1995; Fitzpatrick et al., 1996; Daviesetal., 2003a, 2003b; Langdon et al., 2005). Использование искусственной почвы или субстрата позволит уменьшить вариабельность результатов исследований в ряде повторностей. Так, некоторые авторы эмпирическим путем выявили наиболее оптимальный стандартизированный субстрат, состоящий из 20 % каолиновой глины, 70 % кварцевого песка, 10 % сфагнового торфа и органических частиц (где доля углерода около 5,8 %) и 0,5 % $CaCO_3$ (Conder et al., 2000). Использование стандартизированных почв было вызвано потребностью измерения кинетики химических веществ. Однако, широкий спектр свойств, которыми обладают естественные почвы, отличается от

искусственно созданных субстратов (Ireland, Richards, 1981; Neuhauser et al., 1985; Spurgeon, Hopkin, 2000; Langdon et al., 2005).

В целях изучения биоаккумуляции металлов большинство лабораторных исследований проводится с добавлением солей тяжелых металлов в виде азот-содержащих солей – нитратов. Это характерно для солей свинца (Pb). Некоторые исследователи использовали сульфид свинца (PbS), карбонат свинца ($PbCO_3$), хлорид свинца ($PbCl_2$) (Conder, Lanno, 2000; Davies et al., 2003). В отличие от свинца, в использовании солей цинка (Zn) наблюдается большая вариабельность. В основном, это нитрат цинка ($Zn(NO_3)_2$), также хлорид цинка ($ZnCl_2$). Использование сульфата цинка ($ZnSO_4$) встретилось нам лишь в одной работе (Conder, Lanno, 2000). Из соединений кадмия Cd используют $Cd(NO_3)_2$, также используют $CdSO_4$ и $CdCl_2$. В отличие от вышеперечисленных солей, которые вносятся отдельно, для меди применялись смеси солей – либо смесь сульфата и хлорида меди ($CuSO_4$ + $CuCl_2$), либо сульфата и нитрата ($CuSO_4$ + $Cu(NO_3)_2$) (Marino et al., 1998b; Reinecke et al., 1999; Marino, Morgan 1999). Распространенность использования простых солей металлов в качестве загрязнителя, несомненно, приведет к поправке в ионном составе химического состояния субстратов. При этом, делается поправка к полученным данным, поскольку содержание свободных форм металлов на искусственных средах будет приближенным к естественным загрязненным почвам, находящимся вблизи точечного источника эмиссии. Из солей наиболее часто используются нитраты – вероятнее всего, из-за их высокой растворимости, что позволяет решить проблему добавления высоких концентраций тяжелых металлов в почву. Чтобы воспроизвести естественные условия внесения поллютантов в субстрат, соли металлов, в основном, добавляются в виде растворов (Marino et al., 1998; Reinecke et al., 1999; Marino, Morgan, 1999a; Conder, Lanno, 2000; Davies et al.,2003b). Внесение одной из солей в почву позволяет изучить влияние на животных в диапазоне концентраций этой соли, в то время как другие свойства почв остаются неизменными. Тем не менее, применимость данных, полученных с использованием одного поллютанта, незначительна: в

природе подобные ситуации мало воспроизводимы, поскольку загрязненные почвы содержат более одного загрязняющего агента и, как правило, поллютанты имеют синергетический эффект, усиливая друг друга. Немаловажной проблемой при добавлении металлов в форме раствора является то, что металлы в искусственных условиях обладают большей биодоступностью, чем металлы, содержащиеся в естественно загрязненных почвах (Davies et al., 2003a). Таким образом, токсичность и накопление при использовании искусственно внесенных компонентов наблюдается при более низких концентрациях металлов, чем при естественных. Чтобы избежать нереалистичных показателей, многие исследования проводились с использованием метода сборных проб почв на территориях, подверженных выбросам точечного источника эмиссии. Другой подход к решению данной проблемы состоит в промывании загрязненных почв водой, чтобы удалить излишки ионов металлов. Для создания определенных токсических параметров многие авторы пользуются сборными пробами почв, находящихся на различном расстоянии от металлургических комбинатов (Spurgeon, Hopkin, 1999; Nahmani et al., 2004). Также используются сборные пробы почв, которые находились на территории металлургического комбината, смешанные с модельными субстратами (Edwards et al., 1998; Ma et al., 2002). Такие методы получения субстратов более приемлемы, но также подходят для определенных случаев, когда необходимо установить изолированное влияние компонентов загрязнения почв, без постоянно вносимого вклада источниками загрязнения и без учета климатических условий.

Полевые исследования, в отличие от лабораторных, лишены проблем стандартизации субстратов, при этом они содержат множество переменных, поэтому результаты исследований так же затруднительно экстраполировать. Главным требованием, которое предъявляется при исследовании накопления тяжелых металлов, является необходимость дополнительных исследований с использованием естественно загрязненных почв или полевых исследований.

Такие исследования позволяют изучить синергетические эффекты накопления и токсичности, которые дают более результативные данные для оценки риска.

Также нами не было обнаружено единого временного интервала, в течение которого исследователи выдерживали люмбрицид в искусственно загрязненных почвах. Наибольшее время экспозиции (до 115 суток) нами было встречено в работах Ж. Бенгстона (1985), Ф. Марино и Д. Моргана (1999) – до 90 суток. Средние по продолжительности эсперименты встречены в работах Д. Кеннета (2002) – 76 суток. Однако, в тестах на острую токсичность время экспозиции может быть гораздо ниже, например, 3 суток (Marinussen, van der Zee, 1997; Marinussen et al., 1997a).

В полевых исследованиях дождевые черви должны подвергаться воздействию поллютантов всю свою жизнь, и, вероятно, что в течение последующих поколений дождевые черви могут приспособиться к загрязняющим веществам (Reid, Watson, 2005). Это значительно осложняет экстраполяцию таких данных на всю систему, поскольку концентрации поллютантов для приспособленных видов могут быть гораздо больше, чем для видов, неадаптированных под данные химические условия окружающей среды. В исследованиях по изучению кинетики поглощения и выведения тяжелых металлов есть вариации не только в продолжительности эксперимента, но также в отборе проб. Становится затруднительным сравнивать показатели накопления металлов в экспериментах, проведенных при разных временных масштабах. Кинетические эксперименты указывают на то, что во время фазы поглощения некоторые металлы, например, Pb (Van Straalen et al.,2001), Cu (Marinussen, 1997), Cd (Morgan et al., 1989), не достигли устойчивого состояния в дождевых червях независимо от того, как длительно поллютанты воздействовали на организм. Большинство авторов в своих работах придерживаются мнения, что достаточное время экспозиции находится в интервале между 21 и 28 сутками (Edwards et al., 1998; Scott-Fordsmand et al., 2000; Ma et al., 2002; Friis et al., 2004). Авторы указывают, что данный временной промежуток позволяет проводить большую часть исследований для

тяжелых металлов. Для работ, в которых необходимо исследовать не только популяционные характеристики, но и кинетику поглощения тяжелых металлов, отмечено, что плато в накоплении отмечается на 40-42 сутки эксперимента (Spurgeon, Hopkin, 1999). Альтернативным подходом является экспресс-тест с промежуточными замерами результатов и последующей экстраполяцией данных (Morgan, Morgan, 1992).

Почти во всех исследованиях, если требовалось измерить концентрацию металлов во всем организме червей, после отбора они проходили процедуру очистки желудочно-кишечного тракта. Как правило, дождевые черви промывались деионизированной или дистиллированной водой и помещались в постоянно темное место на влажную фильтровальную бумагу, иногда при этом добавлялось незначительное количество чистой органической массы в качестве пищи, чтобы люмбрициды сохраняли активность (Pokarzhevskii et al., 2000; Kennette et al., 2002).

Время очистки, так же как и время выдерживания люмбрицид на загрязненном субстрате, различается. Как отмечают многие авторы, оптимальным является время в 3-4 суток (Kennette et al., 2002; Morgan et al., 2002). Некоторые авторы отмечают, что после 24 часов на искусственном субстрате люмбрициды теряют активность, и поэтому выдерживать их больше суток не имеет смысла (Bengtsson et al., 1983; Peijnenburg et al., 1999; Scott-Fordsmand et al., 2000). Несколько исследований посвящено очистке кишечника на протяжении 7 суток и более (Palzenberger et al., 1995; Scaps et al., 1997; Dai et al., 2004). Также нами были встречены методики, при которых кишечник люмбрицид промывался с помощью спринцовки (Denneman, 1994; Morgan, Morgan, 1998).

В некоторых исследованиях червей усыпляют без какого-либо предварительного очищения и очищают кишечник после вскрытия (Bouche, 1995; Abdul Rida, Bouche´,1995; Friis et al., 2004). Различные методики очищения желудочно-кишечного тракта после токсической нагрузки в виде внесения солей тяжелых металлов в субстрат также влияют на последующую

погрешность в измерениях накопления поллютантов, поскольку дождевые черви вместе с естественным самоочищением теряют накопленные металлы через кожные выделения (Arnold et al., 2003).

Из всех встреченных нами исследований, проведенных на накопление поллютантов в дождевых червях, только несколько описывают модель прогнозирования нагрузки на организм люмбрицид от содержания тяжелых металлов в почве и подстилке (Corp, Morgan, 1991; Lock, Janssen, 2001b; Grelle, Descamps, 1998; Peijnenburg et al., 1999; Heikens et al., 2001).

Модель представлена лог-линейной регрессией вида:

$$\log Ce = a \log Cs + b, \quad (1)$$

где Ce – концентрация металлов в дождевом черве (мкг/кг),

Cs – концентрация металлов в почве (мкг/кг), a и b – константы.

Большинство моделей были получены для Pb, Cu, Cd, Zn. Также одна работа посвящена изучению накопления Sr, действие которого направлено на замещение кальция в известковых железах люмбрицид (Morganetal., 2002). Только в одном исследовании сообщается о слабой корреляции соотношения содержания тяжелых металлов между почвой и дождевыми червями (Beyer etal., 1987).

Во всех других исследованиях отмечен высокий уровень корреляции содержания металлов в почве, подстилке и дождевых червях. Проанализировав ряд работ, мы получили средние значения корреляции: для кадмия – от 0,37 до 0,59, для свинца – от 0,52 до 0,88, для меди – от 0,1 до 0,37, для цинка – от 0,11 до 0,33. Причем разброс данных Cu и Zn значительно выше, чем второстепенных элементов Pb и Cd, что может указывать на регулирование основных (характерных) элементов, присутствующих в организме люмбрицид, нежели чуждых для него (Королёва, 1984).

Некоторыми авторами отмечено, что не существует определенной видоспецифичности в накоплении тяжелых металлов в тканях. Эти исследователи исходят из предположения о сравнительно одинаковой скорости метаболических процессов люмбрицид (Grelle , Descamps, 1998; Peijnenburg et

al., 1999; Heikens et al., 2001). Первоочередными факторами в данном случае выступают типы почв и местообитание дождевых червей.

В результате биоаккумуляции загрязняющих веществ дождевыми червями уменьшается их концентрация в почве, что можно объяснить переходом растворимых солей тяжелых металлов в нерастворимые (Crossley et al., 1995).

В работах, посвященных влиянию свойств почв на адсорбцию тяжелых металлов дождевыми червями, нами были найдены противоречивые данные. В работах Кеннета (2002) почвы не играли никакой роли, в то время как в работах Бейера (1987) отмечалось большое влияние типа почв на кинетику накопления поллютантов.

Многие авторы связывают повышение концентрации тяжелых металлов в тканях дождевых червей на почвах с низким уровнем поллютантов с модифицирующими факторами, такими как pH, содержанием органического вещества и размером включений в виде алюмосиликатов. (Morgan, 1988; Hopkin, 1989; Соболев, 1991; Ma, 2002).

Показано, что общее содержание металла в почве и подстилке и уровень pH являются основными факторами, влияющими на накопление металла дождевыми червями. Чем меньше значение pH, тем больше адсорбция (Ma, 1982; Morgan, 1988; Peijnenburg et al., 1999). Также увеличение содержания органических веществ увеличивает емкость катионного обмена металлов и содержание частиц алюмосиликатов (Ma et al., 1983; Beyer et al., 1987; Lock, Janssen, 2001, 2001a). С помощью лабораторного ступенчатого извлечения подстилки была рассчитана скорость выщелачивания следа элементов в присутствии люмбрицид: относительно быстро утратил подвижность в вермикомпосте As, а затем Cu и Zn (Kang et al., 2011; Oluyinka et al., 2012).

Некоторые исследователи изучают накопление тяжелых металлов в динамике, используя радиоактивные маркеры (Crossley et al., 1995). Отдельные исследования показали, что накопление металла и его экскреция зависит от

вида люмбрицид. Так, Д. Спержен с соавт. (1999) обнаружил быстрое поглощение и выведение цинка *E. fetida*, в то время как Ф. Марино с соавт. (1999) обнаружил медленное в сравнении поглощение цинка видом *L. rubellus*. Исследования также показали, что накопление и экскреция может отличатья между металлами. Например, Д. Кросли с соавт. (1995) установил, что для *E. fetida* поглощение Zn было относительно быстрым, в то время как поглощение несвойственных организму металлов более низкое. Точно так же Д. Сперджен с соав. (1999) обнаружил медленную экскрецию для Cd и Pb, таким образом, показав кумулятивность данных элементов для люмбрицид. Развивая теорию эссенциальных элементов, исследования В. Пенинбурга (1999) показали быстрое поглощение и уравновешивание с окружающей средой концентраций хрома, меди, никеля и цинка и малое поглощение кадмия и свинца. Эти исследования подтверждают гистологические работы, которые показывают, что неэссенциальные элементы обезвреживаются за счет глобулярных белков металлсвязывающих комплексов, а не за счет выделения (Cancio et al., 1995). Моделирование кинетики поглощения обычно проводится с помощью модели Ж. Аткинса (1969). Эта модель предполагает, что животное представляет собой однородную систему с постоянной скоростью экскреции и имеет общий вид:

$$Qt = Co + (a/k)(1-ekt), \qquad (2)$$

где Qt – концентрация металла в животном,

t – время,

Co – остаточная концентрация,

a – скорость накопления,

k – скорость экскреции.

Кинетика накопления тяжелых металлов дает важную информацию о параметре доза-эффект, то есть показывает, как долго организм может находиться в загрязненной среде, или какое предельное значение концентрации для него должно быть достигнуто прежде, чем это повлечет за собой смертность или другие необратимые изменения. Кроме того, некоторые исследователи придерживаются мнения, что токсичность элементов должна

измеряться не в интегральной концентрации тяжелых металлов, накопленных в организме, а в скорости накопления (Luoma et al., 2005).

Исследования, проводимые на почвах с повышенным содержанием фосфатов, а также искусственное внесение фосфорных удобрений, показали снижение экологического риска для дождевых червей и мезофауны в целом. Внесение высоких концентраций фосфорсодержащих удобрений существенно снизило биодоступность тяжелых металлов (свинец – на 70%, цинк – на 60%, кадмий – на 55%) для люмбрицид, – возможно, благодаря образованию нерастворимых металл-фосфатных комплексов непосредственно в самих почвах (Norland,Veith, 1990; Pierzynski et al., 1994). Данный метод был предложен, наряду с выщелачиванием известью, для биоремедиации почв, находящихся вблизи горнодобывающих и металлоперерабатывающих обьектов (Berti, Cunningham, 1997). Преимущество данного типа биоремедиации с использованием червей заключается в более низкой стоимости по сравнению с другими и отсутствии неоходимости замены загрязненных почв (Berti, Cunningham, 1997). Подобный метод был воспроизведен в лабораторных условиях с использованием вида E. fetida, который показал практически схожий результат. При внесении фосфорорганических удобрений уменьшалась биодоступность тяжелых металлов в тканях люмбрицид, и, соответственно, увеличивалась в копролитах в виде нерастворимых соединений (Pearson et al., 2000; Brinza et al., 2013, 2014).

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом для данной работы послужили исследования, проведенные с 2008 по 2017 г. Работа включала в себя полевой сбор материала на территории стационара ИЭРиЖУрО РАН – окрестностях села Хомутовка Первоуральского района Свердловской области в районе воздействия на окружающую среду Среднеуральского медеплавильного завода (СУМЗ). Сборы проводились с 2008 по 2014 г. каждый полевой сезон с июля по август при стандартых климатических условиях 15-20°С и относительной влажности воздуха 63-73%.

Основные поллютанты СУМЗа представлены диоксидом серы SO_2 с полиметаллической пылью. В пыли преобладают Cu, Pb, Zn, Cd. Общий объем эмиссии в конце 1980-х составлял более 140 тыс. т/год, в том числе (в т/год): SO_2 – 134089, Cu – 2610, Zn – 1754, Pb – 564. С середины 1990 х отмечено снижение выбросов, общий объем в середине 2000-х составил менее 30 тыс. т/год (Кайгородова, Воробейчик, 1996).

Параллельно проводились лабораторные эксперименты (2008-2017 г) с использованием почвенного субстрата и червей, отобранных на фоновой и буферной зоне (Табл. 1).

Таблица 1 – Координаты точек сбора почвенного субстрата и червей

№ точки	Координаты точек сбора для фоновой территории		Координаты точек сбора для буферной территории	
	N	E	N	E
1	56° 49' 20"	59° 34' 40"	56° 57' 01"	59° 46' 30"
2	56° 49' 18"	59° 34' 45"	56° 57' 04"	59° 46' 12"
3	56° 49' 13"	59° 34' 33"	56° 51' 03"	59° 46' 15"
4	56° 49' 18"	59° 34' 33"	56° 50' 59"	59° 46' 29"
5	56° 49' 23"	59° 34' 42"	56° 51' 30"	59° 48' 06"
6	56° 47' 52"	59° 25' 43"	56° 51' 33"	59° 57' 43"
7	56° 47' 56"	59° 25' 48"	56° 51' 35"	59° 48' 03"
8	56° 48' 00"	59° 25' 53"	56° 51' 38"	59° 48' 06"
9	56° 48' 10"	59° 25' 42"	56° 51' 31"	59° 48' 1"
10	56° 47' 51"	59° 25' 34"	56° 51' 16"	59° 49' 19"

Таким образом, количество равноудаленных друг от друга площадок для буферной территории равнялось 10, так же как и для фоновой. Для сборных проб почв и подстилки каждая из площадок разбивалась на 10 случайным образом отобранных квадратов площадью 1м^2.

Места сбора отмечены на карте (Рис. 1).

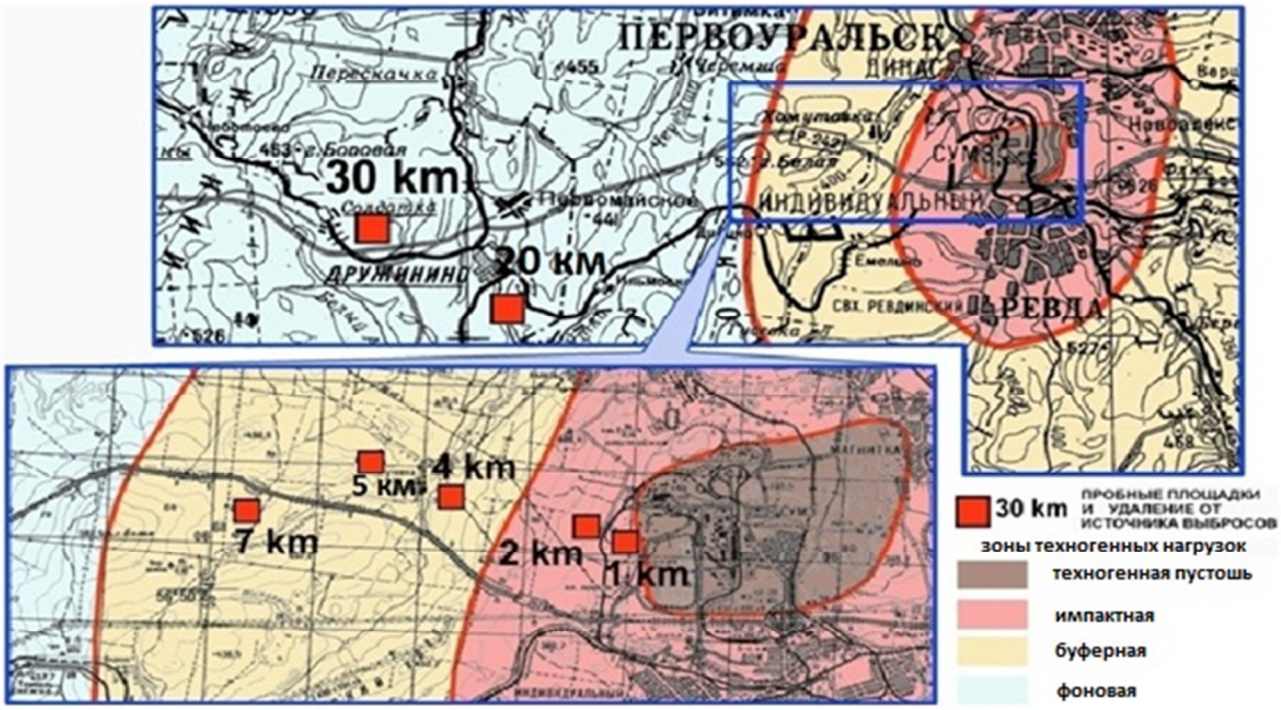

Рисунок 1 – Расположение пробных площадей на зонах техногенной нагрузки

2.1. Характеристика исследуемых площадок

Территория, на которой проводились исследования, относится к таежной биоклиматической зоне, к провинции низкогорной полосы Среднего Урала (абсолютные высоты – от 150 до 450 м над уровнем моря). Доминируют темнохвойные леса и производные от них хвойно-лиственные. На импактных территориях уменьшается полнота и сомкнутость древостоя; разнотравные и разнотравно-злаковые ассоциации сменяются хвощово-злаковыми, которые, в свою очередь, сменяются хвощово-моховыми и мертвопокровными. В импактной зоне травяной ярус фрагментарен; в увлажненных местах сильно

развит моховой покров из *Pholianutans*; имеются участки с почти полным отсутствием подстилки и гумусного горизонта (Воробейчик, 2003).

Почвы – бурые горно-лесные, темно-серые, серые, оподзоленные и глееватые (Воробейчик, 1998). Территория характеризуется резкими колебаниями температур и формированием погодных аномалий. Средняя температура января − -13,6°С. Средняя температура июля − +18,5°С. Среднегодовое количество осадков – 508 мм.

Исходя из результатов химического анализа снега и почвы, подстилки на содержание загрязняющих веществ, в западном направлении от СУМЗа, выделены импактная (до 3 км), буферная (3-7 км) и фоновая (20-30 км) зоны загрязнения (Воробейчик и др., 1994). В зависимости от реакции биоты, данные зоны могут варьироваться и иметь другие значения. Например, для дождевых червей импактная территория начинается с 4 км, т.к. на расстоянии менее 4 км от завода черви не обнаружены (Воробейчик, 1998). При приближении к источнику эмиссии pH водной вытяжки снижается до 4,66±0,10. На контроле количество подвижных форм меди меньше, чем в подстилке. При приближении к заводу содержание меди в подстилке становится больше по сравнению с почвой. В буферной и импактной зоне количество меди в подстилке увеличивается в 2,5 и 3,3 раза соответственно (до 4398,91±248,87 мкг/г). На этих же территориях в почве увеличивается содержание меди в 1,72 на буферной и 2,42 раза импактной территории (максимально 1374,53±150,37 мкг/г). По показателю ПДК подвижных форм меди равняется 28, 56 и 189 для фоновой, буферной и импактной территории соответсвтенно. Распределение подвижных форм свинца (Pb) в почве и подстилке соответствует данным других авторов (Безель., 2006). Содержание данного металла на фоновой территории в подстилке и почве статистически не различается. Количество металла, находящегося в подстилке, увеличивается в 1,80 и 2,49 раз, а в почве – в 1,47 и 1,55 раз на буферной и импактной территории соответственно.). По показателю ПДК подвижных форм свинца для фоновой 1,7, для буферной 2,6, для импактной территори 3,8. Увеличение подвижного кадмия (Cd) в подстилке

на буферной территории в 1,46 раза и импактной – в 1,81 раза выше, чем на фоновой. Значения концентрации кадмия в почве в 1,72 и 5,00 раз больше на буферной и импактной территориях соответственно. Распределение кадмия в почве на исследованных территориях характеризуется мозаичностью: на импактных территориях (6,7 ПДК) и зоне люмбрицидной «пустыни» – месте, где отсутствуют условия для проживания люмбрицид (5 км к СУМЗу и ближе), концентрация металла, в среднем, в 2,5-3 раза выше, чем на фоновых территориях (1,7 ПДК). Подвижные формы цинка в подстилке увеличиваются в 0,12-0,49 раз, в почве – в 0,13-55 раз. Разница концентраций цинка в верхних горизонтах субстрата превышает содержание металла в почве в 3,68 раза на буферной и в 6,25 раза – на импакной территории (12 ПДК), в отличие от фоновых значений на исследуемых территориях (Воробейчик с соавт., 2012).

Таким образом, в отличие от фоновой территории, где концентрация тяжелых металлов в почве превышает концентрацию в подстилке, на буферной и импактной территории концентрация металлов выше в подстилке, чем в почве, причем с приближением к источнику эмиссии усиливается разница в данном показателе. Для зоны умеренного загрязнения $p<0,01$, для сильного и очень сильного – $p<0,001$ (Безель, 1982).

2.2. Методы сбора

Сбор дождевых червей для определения содержания тяжёлых металлов и морфометрических показателей проходил в елово-пихтовых лесах на разной удаленности от СУМЗа (5, 7, 20, 30 км). Места сбора были приближены к опытным площадкам, на которых был установлен химический состав почв и подстилки в ходе картирования территории вблизи СУМЗа (208 пробных площадей размером 25×25 м) (Воробейчик, 2003). Площадь была разбита на 10 участков, случайно размещенных на полигоне исследований, на расстоянии 50-100 м друг от друга. Координаты каждого участка фиксировались с помощью GPS-навигатора GARMIN. Прикопка охватывала лесную подстилку и верхний

(0-10 см) почвенный слой. Поиск люмбрицид проводился в сырых местах в верхнем слое почвы (5 см), но в основном в лесной подстилке (это связано с экологическими особенностями искомых люмбрицид). На расстоянии в 4 км черви были обнаружены в древесине гнилых деревьев. Подстилка разрыхлялась с помощью садовых мини-грабель. Дождевые черви с каждого участка помещались в отдельную пластиковую емкость (пробник) с небольшим количеством подстилки и закрывались перфорированной крышкой. После чего на каждый пробник приклеивалась этикетка, на которую наносились данные о месте сбора (координаты, расстояние от завода, № участка), с последующим переносом данных в полевой дневник.

Для изучения количественных показателей дождевых червей сбор проходил на вышеописанных площадках, в елово-пихтовых лесах на разной удаленности от СУМЗа (4, 5, 7, 20, 30 км). Производился ручной разбор почвенных и подстилочных пластов. Размер одного пласта равнялся 25х25 см, толщина монолита составляла 25–30 см в зависимости от пород, подстилающих почвенно-подстилочный слой, и наличия древесно-растительных остатков в почве, а также особенностей нахождения люмбрицид в субстрате. Для стандартизации характеристик популяций люмбрицид все количественные оценки были пересчитаны на 1м^2. При оценке распределения червей в горизонте субстрата почвенно-подстилочный монолит делился на почву и подстилку, далее осуществлялся непосредственно разбор образцов. На каждой площадке было отобрано 10 почвенных монолитов, которые располагались на территории в хаотичном порядке. Далее дождевые черви очищались от почвы при помощи 40%-ного этилового спирта и фиксировались в 97%-ном этиловом спирте с глицерином для сохранения эластичности собранных образцов. После фиксации, в условиях стационара, дождевых червей определяли по таким признакам, как расположение щетинок и семеприемников, форма головной лопасти, расположение пояска зрелости (для половозрелых особей) по монографии Т. С. Всеволодовой-Перель (1997). Определение видов подтверждено Е. В. Головановой

2.3. Методы лабораторных исследований

Популяционные характеристики червей изучались по оригинальной методике, оптимальной для условий лаборатории, с использованием пластиковых сосудов ёмкостью 2 л. На дно сосудов помещался крупный дренаж слоем 2 см. Сверху укладывался почвенный субстрат слоем 12 см. Для этого нами отбирались сборные пробы почвы и подстилки из трех площадок в зоне 5 км от Среднеуральского медеплавильного завода и трех площадок в зоне 30 км от источника эмиссии. В качестве подстилки использовался моховой пласт. В каждый сосуд помещались по 10 половозрелых и 5 ювенильных особей. Опыт проводился в пятикратной повторности для загрязнённых и пятикратной – для контрольных почв. Сосуд покрывался хлопковой тканью, которая закреплялась с помощью медицинского жгута, чтобы избежать выползания дождевых червей. Опыт проводился на видах: *Perelia diplotetratheca* и *Lumbricus rubellus*, собранных на фоновой территории (30 км на запад от завода).

Для изучения вертикального распределения различных возрастных групп и других параметров почвенно-подстилочный субстрат в сосудах разбирался послойно: 0-4 см, 4-8 см, 8-12 см. Почва по слоям выкладывалась на клеенку и производился ручной разбор с фиксацией результатов методом конвертов.

Для очищения желудочно-кишечного тракта дождевых червей использовалась модификация методики А.Д. Покаржевского, которая заключалась в четырехсуточном выдерживании люмбрицид на микробиологической среде агар-агар с концентрацией 4-4,5 г/литр воды. Поскольку от пробоподготовки зависит точность и воспроизводимость результатов в серии опытов при использовании дождевых червей в качестве биотестов для определения накопленных веществ в их тканях, многие исследователи сталкиваются с проблемой очищения желудочно-кишечного тракта дождевых червей, так как его содержимое (копролиты) вносит дополнительные, а часто и значимые изменения концентрации измеряемых

веществ. К тому же не существует единой стандартизированной методики очищения желудочно-кишечного тракта люмбрицид, которая бы подходила под выполнение наибольшего числа критериев для выполнения задач, стоящих перед исследователем. Исходя из этого, нами был проведен сравнительный анализ методик очистки люмбрицид, встреченных в литературе.

В основе **метода очищения содержимого желудочно-кишечного тракта дождевых червей** лежит метод замещения содержимого желудочно-кишечного тракта на субстрат агар-агар. Для приготовления субстрата необходим агар-агар в расчете 4-4,5 г (концентрация установлена опытным путем и является наиболее благоприятной для люмбрицид) сухого вещества на 1 литр деионизированной или дистиллированной воды (в нашем опыте использовался дистиллят). Приготовленный субстрат переливают порциями по 480 мл в полипропиленовую емкость объемом 500 мл. Когда субстрат станет густым и приобретет комнатную температуру, в емкость помещаются по 14-15 особей червей. Контейнер накрывается хлопковой тканью, которая закрепляется с помощью медицинского жгута, чтобы избежать выползания дождевых червей. Далее контейнер ставят в темное место (картонную коробку и т.п.) при комнатной температуре на 4 суток. Ежедневно емкости осматриваются с целью удаления погибших особей. По истечении 4 суток каждая особь вынималась из контейнера, проходило вскрытие кишечника червей, который рассматривался под бинокуляром при сильном освещении на наличие остаточных комков. Желудочно-кишечный тракт не должен содержать остаточных включений. Если при вскрытии обнаруживаются данные включения, такой материал является непригодным для дальнейшей работы.

Метод сатурированной фильтровальной бумаги. В чашки Петри закладывается фильтровальная бумага, которая пропитывается водой до полного насыщения. Избыток воды удаляется. Животное помещается в чашки Петри. Дождевых червей перед посадкой споласкивают в воде. Выдерживаются животные в течение 2-3 дней при температуре 16-20°С. Далби и др. отмечают,

что выдерживания животных на субстрате в течение трех суток достаточно для полного освобождения кишечника дождевых червей (Dalbi et al., 1996).

Метод эвакуации содержимого желудка дождевых червей с помощью измельченной целлюлозы. Метод разработан нами. Измельченная фильтровальная бумага помещается в чашки Петри, увлажняется до образования густой кашеобразной массы, без образования свободной воды на дне чашки, далее в чашки помещаются исследуемые животные. Емкость покрывается хлопковой тканью, которая фиксируется медицинским жгутом во избежание выползания люмбрицид. Выдерживается при температуре 20°С в течение 4 суток.

Поскольку люмбрициды обладают отрицательным фототаксисом, чашки Петри с животными выдерживались в темном месте (Tajlor, Middleton, 2004). В основе последних двух методов лежит замещение содержимого пищеварительного тракта на химически чистый субстрат. Принципиально отличается от них метод сатурированной фильтровальной бумаги, который заключается в «сухой» эвакуации содержимого пищеварительной системы люмбрицид, основанной на том, что в организм люмбрицид не поступают новые порции субстрата при продолжении естественного процесса опорожнения кишечника особей. Метод со вскрытием и ручной очисткой пищеварительного тракта червей не рассматривался, так как это довольно трудоемкий процесс, к тому же при дифференциальном исследовании тканей их можно повредить. Для экспериментов был выбран вид дождевых червей *Eiseniafetida (Savigny, 1826),* который является наиболее подходящим и часто используемым видом в лабораторных условиях (Lee., 1985). Перед закладкой эксперимента люмбрициды выдерживались 3 суток на типичном для них субстрате, тем самым создавались стандартные условия по содержанию включений в желудочно-кишечном тракте организмов для всех повторностей. Каждая серия опытов состояла из 5 повторностей, в каждую емкость помещалось по 5 половозрелых особей. Контролем послужили экспериментальные данные по содержанию остаточных включений в

пищеварительной системе 50 особей *E. fetida,* которые не использовались в методиках очистки, а непосредственно вскрывались после выдерживания на типичном субстрате. Всего в ходе эксперимента использовалось 150 особей. Ежедневно емкости осматривались с целью удаления погибших особей. По истечении 4-х суток каждая особь вынималась из контейнера, проводилась фиксация с последующим вскрытием пищеварительного тракта люмбрицид и количественно учитывалось наличие остаточных включений в кишечнике. В данном исследовании остаточными включениями считались комки субстрата размером 1–3 мм.

Пробоподготовка объектов для анализа на тяжелые металлы начинается с сушки червей и осуществляется в сушильном шкафу при температуре 60ºС. Перед началом сушки черви на 1 минуту помещаются в 40%-ный этиловый спирт, далее промываются дистиллированной водой и укладываются в виде кольца в стерильные чашки Петри (в нашем случае обработанные 96%-ным раствором этилового спирта). Возле каждой особи на чашке Петри маркером ставится учетный номер. Далее чашки Петри помещаются в сушильный шкаф при вышеуказанной температуре на 1 сутки. По истечении времени чашки вынимаются и оставшееся сухое вещество на поверхности чашек отделяется с помощью скальпеля. Сухое вещество от каждого червя помещается в отдельный zip-пакет и этикетируется стандартными методами, с указанием места сбора.

Химический анализ. В каждой пробе подстилки и почвы ионометрически определили актуальную кислотность (водная вытяжка, соотношение подстилка: вода равно 1:25). Для измерения содержания подвижных форм Cu, Cd, Pb и Zn использовали вытяжку 5%-ной HNO_3 (соотношение субстрат: кислота равно 1:10, время экстракции – 24 часа после однократного встряхивания). Данный экстрагент, как и другие сильные кислоты, позволяет анализировать не только доступные биоте формы тяжелых металлов, но и потенциально мобилизуемые (Ладонин, 2003). Концентрации

металлов в почве и подстилке измерили на атомно-абсорбционном спектрометре AAS–3 (CarlZeiss, Германия).

Для измерения содержания металлов в тканях червей использовали около 100 мг материала (навеску взвешивали с точностью до 0,0001 г), образцы озоляли в тефлоновых сосудах в микроволновой печи MWS-2 (Berghof, Германия) в течение 80 мин. после добавления 7 мл концентрированной HNO_3 и 1 мл деионизированной воды при максимальном давлении 900 кПа и максимальной температуре 155 ^{o}C. Концентрации металлов (Cu, Pb, Cd, Zn) в тканях измерили на атомно-абсорбционном спектрометре AAS Vario 6 (Analytic Jena, Германия) с пламенным вариантом атомизации.

Химические анализы выполнены в лаборатории экотоксикологии популяций и сообществ Института экологии растений и животных УрО РАН, которая аккредитована на техническую компетентность и зарегистрирована в государственном реестре РФ (аттестат РОСС.RU0001.515630).

2.4. Статистический анализ

Для статистической обработки данных использовались стандартные методы описательной статистики (Зайцев, 1991).

Для проверки гипотезы о принадлежности выборок теоретическому закону распределения использовали критерий согласия Пирсона (критерий χ^2).

Значимость различий в концентрациях элементов между выборками оценивали при помощи однофакторного дисперсионного анализа, предварительно логарифмировав значения с использованием программного пакета Statistica 12.0.

Значимость различий в выборках в ходе эксперимента оценивали с помощью непараметрического дисперсионного анализа – рангового критерия Фридмана (Зайцев, 1991).

Для упрощения интерпретации данных касаемо токсической нагрузки

среды использовался индекс токсичности K_i (Воробейчик с соавт., 1994), который рассчитывается по следующей формуле:

$K_i = D_i / \min(D_i)$, (3)

$D_i = [Cu]_I / [Cu]_f + [Pb]_i / [Pb]_f + [Zn]_I / [Zn]_f$, (4)

где $[\ ]_I$ – концентрация элемента на i-той площадке,

$[\ ]_f$ – концентрация элемента местного фона.

Индекс измеряется в относительных единицах и показывает, во сколько раз превышены фоновые концентрации в объектах окружающей среды в среднем по всем металлам.

Для расчета коэффициента аккумуляции использовалась модификация вышеописанной формулы. Для каждого элемента:

$K_к = C_i / C_{фон} – C_{фон}$, (5)

где $K_к$– коэффициент аккумуляции,

C_I – концентрация элемента в объекте исследования на i-той площадке,

$C_{фон}$ – концентрация элемента в объекте исследования местного фона.

Для многоэлементного загрязнения с априорным признанием аддитивности действующих доз отдельных компонентов (Безель., 2006)

$K = 1/N \Sigma\ C_i / C_{фон} – C_{фон}$, (6)

где К – интегральный коэффициент кумуляции,

C_I – концентрация элемента в объекте исследования на i-той площадке,

$C_{фон}$ – концентрация элемента в объекте исследования местного фона.

3. РЕАКЦИЯ ДОЖДЕВЫХ ЧЕРВЕЙ НА ЗАГРЯЗНЕНИЕ ПОЧВ В ЕСТЕСТВЕННЫХ УСЛОВИЯХ

3.1. Изменение характеристик населения люмбрицид в зависимости от расстояния до источника эмиссии в полевых условиях

Как показано в таблице 2, в период исследований на площадках в ельниках-пихтарниках выявлено 9 видов люмбрицид из 12, характерных для Среднего Урала (Перель, 1979; Всеволодова-Перель, 1997). Из них 2 вида являются эндемиками Среднего Урала: *Perelia diplotetratheca* (Perel,1976), *Perelia tuberosa* (Svetlov,1924). Один вид распространен на территории Сибири и Дальнего Востока – *Eisenia atlavinyteae* (Perel et Graphodatsky, 1984). Остальные виды относятся к видам широко распространенным – космополитам: *Dendrobaena octaedra* (Savigny, 1826), *Octolasion tyrtaeum* (Orley,1885), *Aporrectodea rosea* (Savigny,1826), *Dendrodrilus rubidus tenuis* (Eisen,1874), *Aporrectodea caliginosa* (Savigny, 1826), *Lumbricus rubellus* (Hoffmeister,1843).

На всей исследуемой территории доминантом является вид *Perelia diplotetratheca* (Perel,1976). На фоновой территории его количество составило 80% от общей численности; в семи километрах от завода (в первой буферной зоне) численность данного вида упала в 1,2 раза, что составляло 85% от всех особей на данном километре; на территории 5 км от завода (во второй буферной зоне) наблюдается снижение численности в 5,8 раза (74%).

Субдоминантом является вид *Dendrobaena octaedra* (Savigny,1826). На фоновой территории количество особей данного вида составило 8% от всех особей на фоновой территории; в 7 км от завода количество *D. octaedra* снизилось в 1,2 раза; на территории 5 км от завода численность снизилась в 3,8 раза. Доля остальных видов составляла менее 7%. На площадках, расположенных в 2-4 км от источника эмиссии, черви в количественных учётах отсутствовали. При качественных сборах на импактной территории был

обнаружен вид *Dendrodrilus rubidus tenuis* (Eisen,1874), который обитал в древесине упавшего дерева, подвергшегося деструкции. Из-за местообитания, не соответствующего схеме исследований количественных учетов, данный вид не учитывался. Закономерности проявлялись независимо от года исследования.

Таблица 2 – Численность (экз./м^2) Lumbricidae в разных зонах токсической нагрузки (среднее ± ошибка среднего)

Вид	**Зона нагрузки, пробная площадь**			
	фон (30 км)	**буфер – 1 (7 км)**	**буфер – 2 (5 км)**	**импакт (4–1 км)**
Perelia diplotetratheca	20,4±3,9	17,0± 5,5	3,5± 1,9	0
Dendrobaena octaedra	2,0± 1,4	1,66± 0,84	0,7± 0,4	0
Eisenia atlavinyteae	0,25± 0,1	0,22± 0,07	0	0
Octolasion tyrtaeum	0,05± 0,03	0	0	0
Aporrectodea rosea	0,17± 0,15	0	0	0
Perelia tuberosa	1,5± 0,87	0	0,5± 0,1	0
Dendrodrilus rubidus tenuis	0	0,21± 0,13	0	0
Aporrectodea caliginosa	0,22± 0,17	0,32± 0,25	0	0
Lumbricus rubellus	0	0,15± 0,03	0	0
Коконы	53,62± 11,05	43± 21,3	1,8± 0,9	0
всего видов	7	6	3	0
всего особей	24,5± 4,05	20± 3,3	4,7± 2,3	0

Примечание. Зона в (км) отражает расстояние от завода.

При приближении к точечному источнику эмиссии наблюдалось неравномерное снижение численности: если для фоновой территории общая численность люмбрицид равнялась 24.5± 4.05 особей на м^2, то в 7 км от завода

численность составила 81%, а в 5 км – 19% от фоновой территории. В отличие от фона, в 7 км от СУМЗа нами не был обнаружен вид *Perelia tuberosa* (Svetlov,1924), но данный вид встречен в 5 км от завода. Также на буфере-2 отсутсвовали такие виды, как *Eisenia atlavinyteae* (Perel et Graphodatsky,1984), *Octolasion tyrtaeum* (Orley,1885), *Aporrectodea rosea* (Savigny,1826), *Dendrodrilus rubidus tenuis* (Eisen,1874), *Aporrectodea caliginosa* (Savigny, 1826), *Lumbricus rubellus* (Hoffmeister,1843). Таким образом, для буфера-1 и буфера-2 общее количесво видов составило 85% и 42% от фоновой территории соответственно. Данные по численности люмбрицид согласуются с индексом видового разнообразия Симпсона и индексом видового разнообразия Маргалефа, которые снижались при приближении к источнику эмиссии поллютантов.

Таблица 3 – Видовое разнообразие и богатство дождевых червей в разных зонах токсической нагрузки

Показатель	**Зона токсической нагрузки**		
	фоновая (30 км)	**буферная – 1 (7 км)**	**буферная – 2 (5 км)**
Индекс видового разнообразия Симпсона	1,45	1,37	1,04
Выравненность	0,69	0,73	0,96
Индекс видового богатства Маргалефа	1,86	1,67	1,3

В таблице 4 представлено распределение обнаруженных видов в соответствии с морфо-экологическими типами и экологическими группами внутри них.

При уменьшении расстояния до Среднеуральского медеплавильного завода пропорционально усиливается процесс элиминации видов дождевых червей, которые питаются собственно перегноем. Данный факт свидетельствует о меньшей устойчивости червей второго морфо-экологического типа к

загрязнению окружающей среды.

С приближением к заводу достоверно увеличивается ($p<0,05$) количество подстилочных и почвенно-подстилочных видов и уменьшается доля почвенных видов, относящихся к первому морфо-экологическому типу.

Таблица 4 – Жизненные формы Lumbricidae (по Перель, 1979)

	Морфо-экологический тип	
	I – питающиеся на поверхности почвы.	**II – питающиеся почвенным перегноем и собственно почвенные**
Морфо-экологическая группа	**1 подстилочные** *Dendrobaena octaedra* (Savigny,1826), *Dendrodrilus rubidus tenuis* (Eisen,1874)	**1 верхнеярусные** *Perelia tuberosa* (Svetlov,1924), *Octolasion tyrtaeum* (Orley,1885), *Aporrectodea rosea* (Savigny,1826)
	2 почвенно-подстилочные, *Perelia diplotetratheca* (Perel,1976), *Lumbricus rubellus* (Hoffmeister,1843)	**2 среднеярусные** *Aporrectodea caliginosa* (Savigny, 1826)
	3 норники *Eisenia atlavinyteae* (Perel et Graphodatsky,1984)	**3 нижнеярусные** Отсутсвуют

Поскольку нижнеярусные виды могут обитать в достаточно рыхлых и хорошо дренированных почвах, в условиях таежной зоны в ельниках-пихтарниках в серых лесных и бурых горных почвах эти виды нами обнаружены не были.

На всех исследуемых площадках преобладает почвенно-подстилочный

тип дождевых червей (Рис. 2).

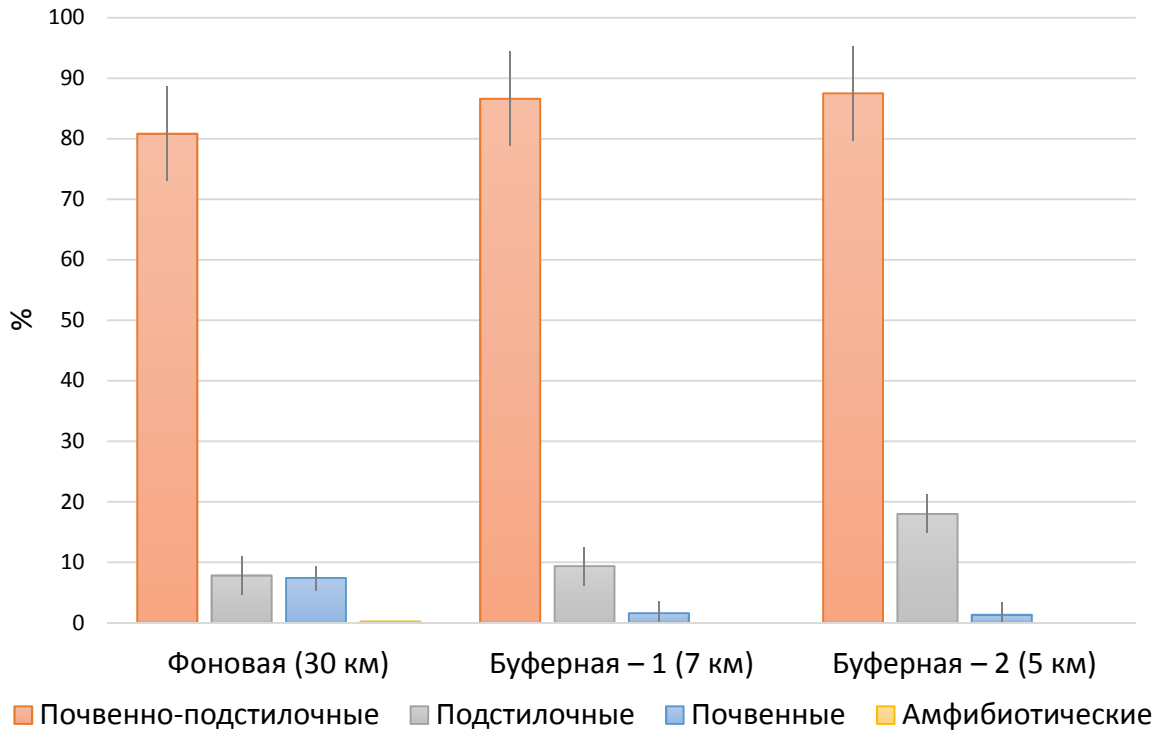

Рисунок 2 – Соотношение экологических групп люмбрицид в различных зонах воздействия (Среднее±ошибка)

С приближением к источнику эмиссии отмечено увеличение доли люмбрицид, находящихся в верхних слоях субстрата ($p<0,05$) (Рис. 3). На фоновой территории люмбрициды были распространены, согласно морфо-экологическим типам, во всех слоях почвы. На буфере–1 снизилась ($p<0,05$) доля люмбрицид в нижнем и среднем слоях почвы, с увеличением люмбрицид в подстилке. При приближении к источнику эмиссии наблюдались те же тенденции: при исчезновении дождевых червей в нижних слоях почвы пропорционально увеличивается доля дождевых червей в подстилке, она выше в 1,7 и 1,4 раза, чем на фоне и буфере–1 соответственно.

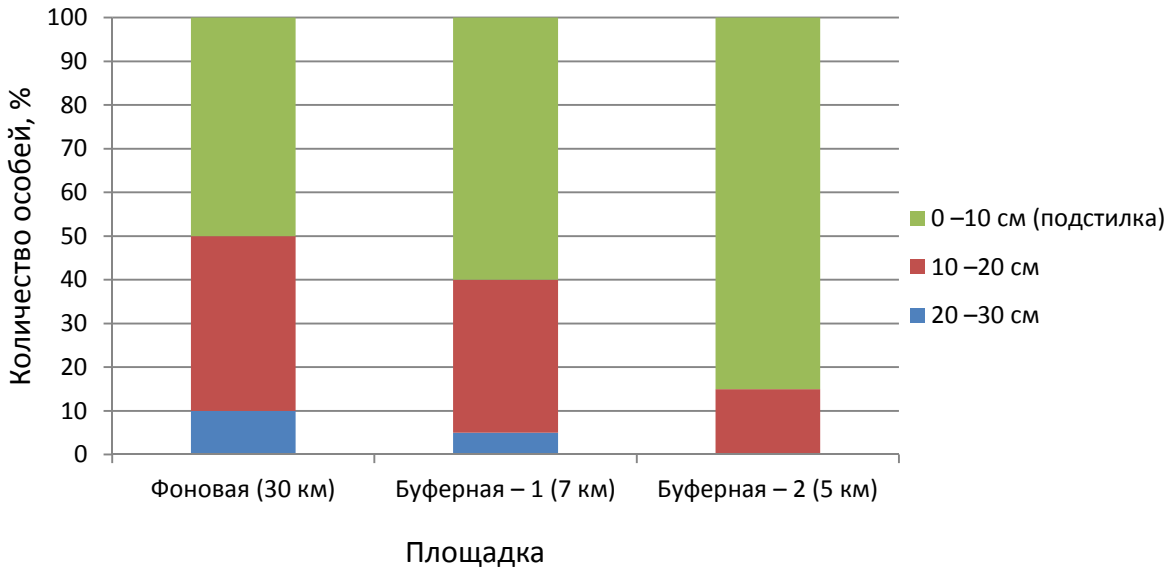

Рисунок 3 – Вертикальное распределение люмбрицид в разных горизонтах субстрата

Статистически достоверная ($p<0,05$) разница наблюдалась в общем количестве коконов люмбрицид на буфере–2 по сравнению с буфером–1 и фоном (См. рис. 4). Между фоном и буфером–1 количество коконов статистически не различалось.

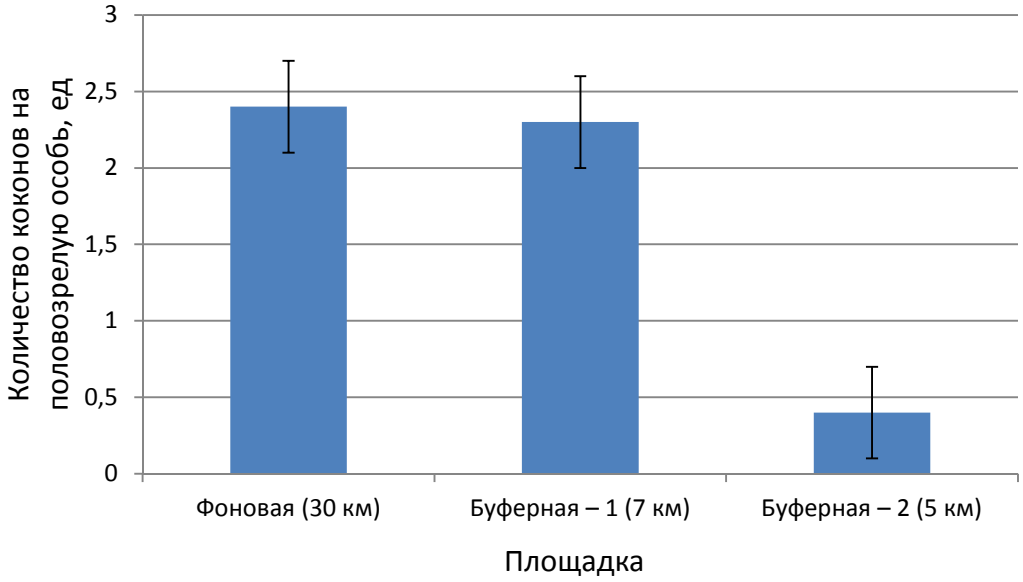

Рисунок 4 – Индивидуальная плодовитость люмбрицид в зависимости от расстояния до источника эмиссии (Среднее±ошибка)

Между фоном и буфером–1 не выявлено разницы в отношении количества коконов к общему числу половозрелых особей – индивидуальной плодовитостью (в среднем на одну особь приходится по 2,16 кокона). Для буферной–2 территории данный показатель (0,3) оказался ниже из-за малого числа коконов и большего числа половозрелых дождевых червей.

Видовое богатство, представленное на рисунке 5, также достоверно ($p<0,05$) уменьшается при приближении к заводу, от 7 обнаруженных видов на фоновой территории до 3 видов на 5 км и полного отсутствия в 4-2 км от источника эмиссии поллютантов.

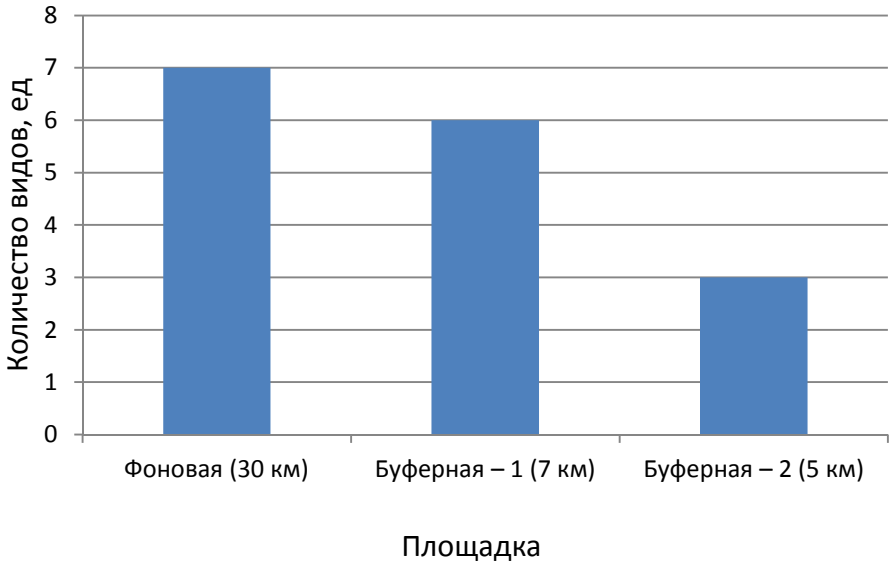

Рисунок 5 – Видовое богатство дождевых червей в зависимости от расстояния до источника эмиссии.

3.2. Изменение морфологических характеристик *P. diplotetratheca* в полевых условиях

Измерение толщины люмбрицид (Рис. 6) проводилось на уровне пояска зрелости. Ранговый критерий Фридмана показал статистически достоверное ($p<0,05$) различие между толщиной червей, собранных на фоновой территории и буфере–2. Средняя ширина поясковой части на контроле составляла 4,06±0,01 мм, в буферной зоне – 3,6±0,1мм.

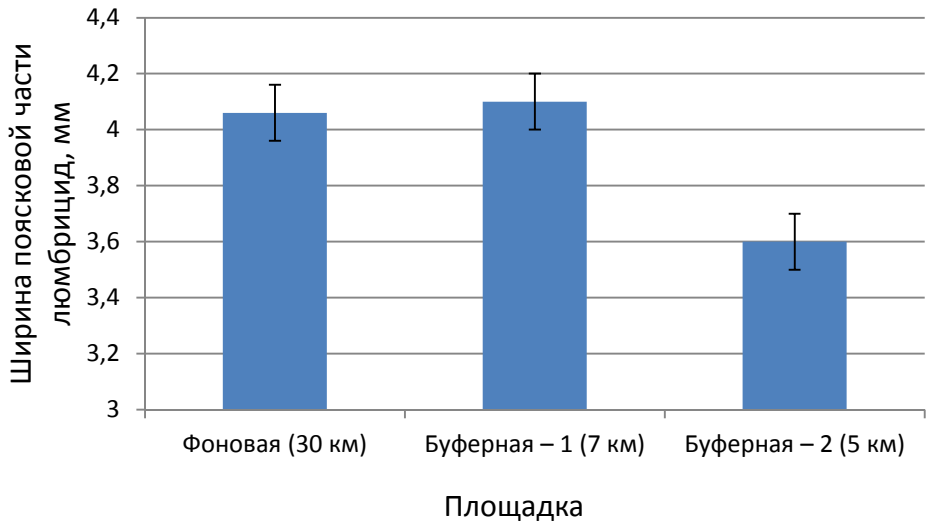

Рисунок 6 – Толщина поясковой части *P. diplotetratheca* в зависимости от расстояния до источника эмиссии (Среднее±ошибка)

Средняя длина люмбрицид на фоновой территории (74±10 мм) статисчитески не отличалась от длины люмбрицид собраных на буфере–1(80±10 мм) и буфере–2 (64±10 мм).

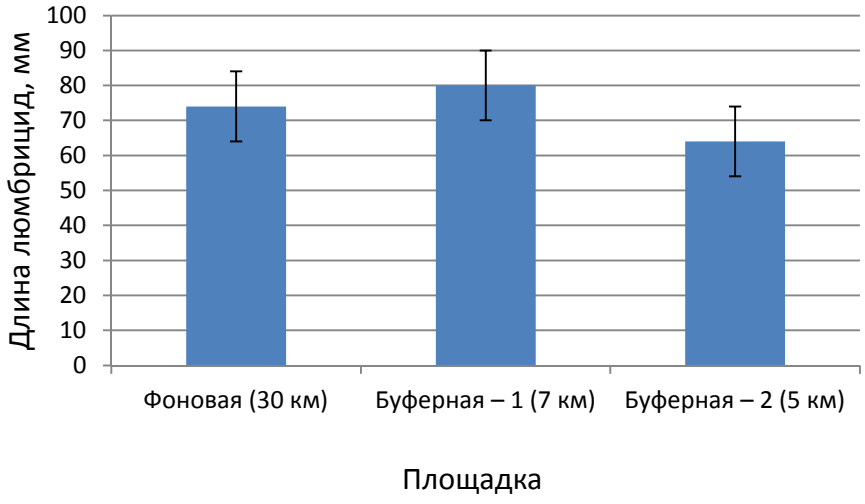

Рисунок 7 – Длина *P. diplotetratheca* в зависимости от расстояния до источника эмиссии (Среднее±ошибка)

Сухая масса люмбрицид (Рис. 8) менялась исходя из двух вышеописанных параметров – длины и толщины. Значения сухой массы дождевых червей, собранных на фоновых площадках, превышали значения

буфера–2 на 27% ($p<0,05$), что составляло 0,086±0,001 г на фоне и 0,063±0,001 г в буферной (2) зоне. Самый большой показатель наблюдался на буфере–1.

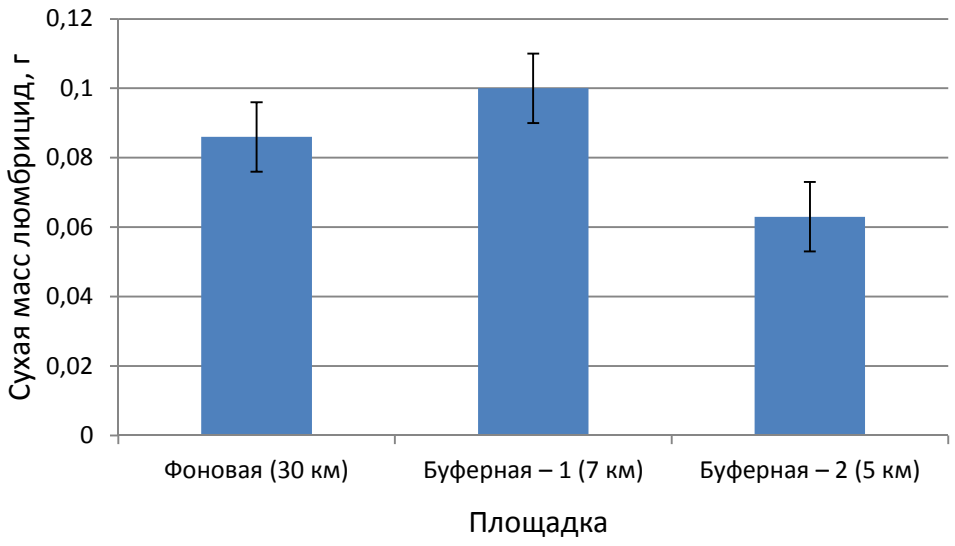

Рисунок 8 – Масса *P. diplotetratheca* в зависимости от расстояния до источника эмиссии (Среднее±ошибка)

4. РЕАКЦИЯ ДОЖДЕВЫХ ЧЕРВЕЙ НА ЗАГРЯЗНЕНИЕ ПОЧВ В ЛАБОРАТОРНЫХ УСЛОВИЯХ

4.1. Показатели населения дождевых червей

Динамика численности. Одним из наиболее значимых показателей, используемых в экспресс-тестах на острую токсичность, является выживаемость половозрелых особей.

Как видно из рисунка 9, в контрольной серии опытов наблюдалась 53%-ая выживаемость особей вида *L. rubellus*.

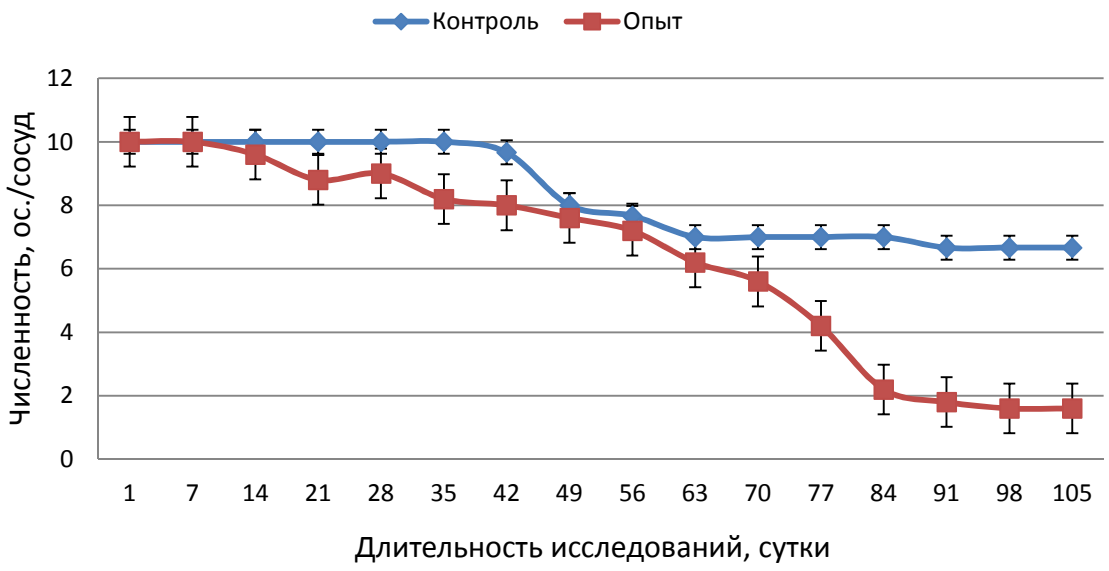

Рисунок 9 – Выживаемость половозрелых особей *L. rubellus* при наличии (опыт) и отсутствии поллютантов (контроль) в почве (Среднее±ошибка)

Наблюдалось снижение численности люмбрицид вплоть до второй половины эксперимента, далее численность стабилизировалась. Смертность дождевых червей на контроле может быть связана с отличиями режима вермикультивирования для данного вида и периодом адаптации к выбранным стандартизированным условиям среды.

При наличии поллютантов воздействие было отмечено с 14 дня исследований и проявилось в снижении численности червей ($p<0,05$). Начиная

с 84 дня исследований на загрязненных почвах начинается постепенная стабилизация числа половозрелых особей. По окончании опытов средняя численность особей в варианте с загрязненной почвой сократилась в 6,25 раз по сравнению с первоначальной численностью. По окончании исследований было отмечено превышение численности на контроле по сравнению с вариантом с загрязненными почвами в 4,2 раза.

Таким образом, комплекс ингредиентов загрязнения способствавал снижению численности половозрелых малых выползков на протяжении всего эксперимента. По данным рангового анализа Фридмана, данная тенденция является достоверной (N = 2, df = 15) χ^2=28,91074, p = 0,01652.

Для вида *P. diplotetratheca,* исходя из рисунка 10, видно, что на контроле наблюдалась 87%-ая выживаемость особей. На контроле отмечалось снижение численности люмбрицид ($p<0,05$) на 28-й и 77-й дни исследований. Далее наблюдалась стабилизация выживаемости половозрелых особей.

При наличии поллютантов критическая точка воздействия наступила так же, как и в опыте с *L. rubellus,* на 14-й день исследований, и наблюдалась тенденция к снижению численности. За время проведения опытов общей стабилизации численности не отмечалось, при этом, в отличие от *L. rubellus*, зафиксировано существенно меньшее ($p<0,05$) изменение численности *P. diplotetratheca*, что, вероятно, говорит о лучшей приспособленности данного вида к условиям вермикультивирования и токсической нагрузке. По нашему мнению, именно поэтому данный вид доминирует по численности в сообществе люмбрицид, обитающих на исследуемых территориях. По окончании опыта средняя численность особей на загрязненных почвах уменьшилась в 1,8 раза по сравнению с исходными данными.

Таким образом, комплекс поллютантов способствует снижению численности половозрелых особей уральского доминирующего эндемика – *P. diplotetratheca*. По окончании исследований численность на контроле превышает в 1,60 раз данные на загрязненной почве (N = 2, df = 15) χ^2 = 26,69650, p = 0,03131.

Элиминация двух видов дождевых червей по показателю выживаемости половозрелых особей *P. diplotetratheca* и *L. rubellus* к загрязнению почвы и подстилки полиметаллической пылью на фоне подкисления SO_2 статистически различается ($p<0,05$). Так же статистически различаются ($p<0,05$) по данному показателю значения у двух видов на контрольных повторностях, что может говорить о разной приспособленности видов к условиям вермикультивирования.

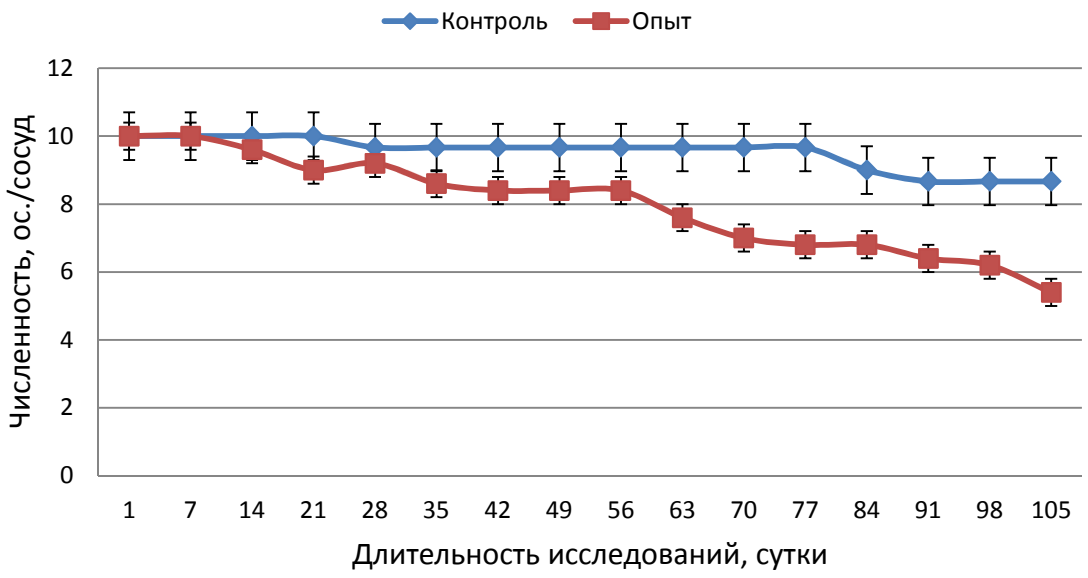

Рисунок 10 – Выживаемость половозрелых особей *P.diplotetratheca* при наличии и отсутствии поллютантов в почве (Среднее±ошибка)

Плодовитость. Под плодовитостью в данной работе нами понимается продукция (откладка) коконов за определенный промежуток времени, приходящаяся на всю популяцию (общая плодовитость), и в пересчете на 1 половозрелую особь (индивидуальная плодовитость).

Для *L. rubellus* в первой половине эксперимента в присутствии поллютантов наблюдался пик откладки коконов. Далее плодовитость резко упала до 0 коконов/сосуд (Рис. 11). Если сопоставить данный график с графиком выживаемости половозрелых особей (Рис. 19), то можно проследить четкую тенденцию массовой гибели люмбрицид, которой предшествовал разовый пик плодовитости во всех повторностях опыта. Начиная с середины

эксперимента, плодовитость имела значение 0 коконов/сосуд и до конца эксперимента не менялась.

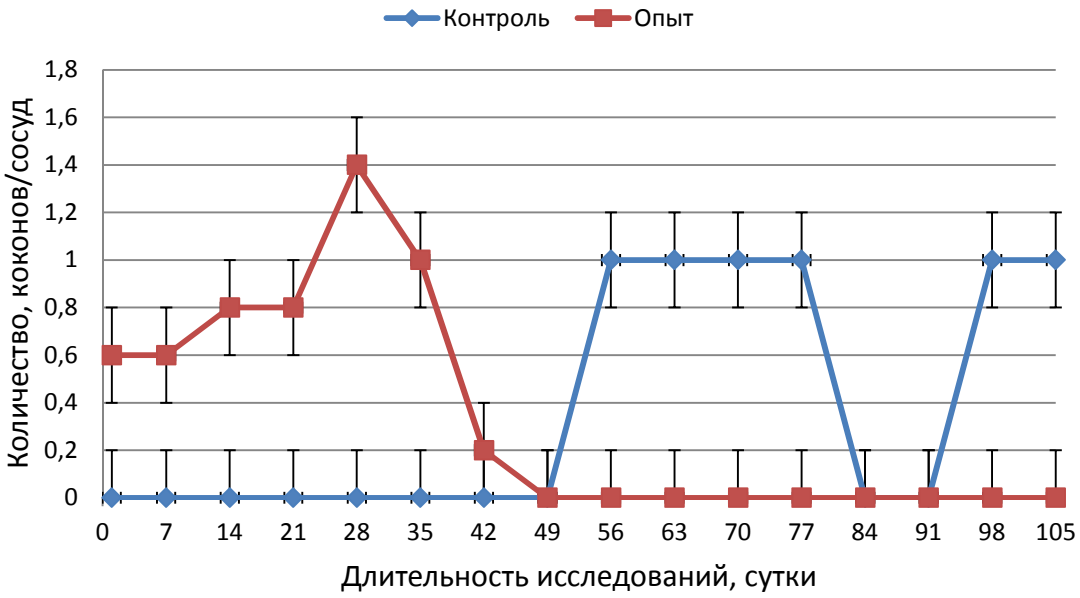

Рисунок 11 – Плодовитость *L. rubellus* при наличии и отсутствии поллютантов в почве (Среднее±ошибка)

На контроле коконы появились в середине и в конце эксперимента. Плодовитость была низкой, но стабильной. Также в конце эксперимента произошел выход ювенильных особей из коконов, что сопровождалось увеличением численности неполовозрелых (Рис. 12). К концу эксперимента в среднем индивидуальная плодовитость составила 0,1±0,02 кокона на особь.

Таким образом, варианты отличались временем откладки коконов. Если на контроле плодовитость низкая, но стабильная и отмечена во второй половине исследований, то в варианте с присутствием поллютантов откладка коконов носит пиковый характер и отмечена в первой половине эксперимента.

Для *P. diplotetratheca* на контроле в начале эксперимента наблюдался кратковременный пик продуктивности со средним количеством коконов 2±0,2 ед./сосуд. Далее, через неделю, появился выплод ювенильных особей. Данный временной промежуток равен показателю в опыте с использованием *L. rubellus*

на контроле. В середине опыта наблюдалось восстановление продуктивности, которое длилось до конца наблюдений.

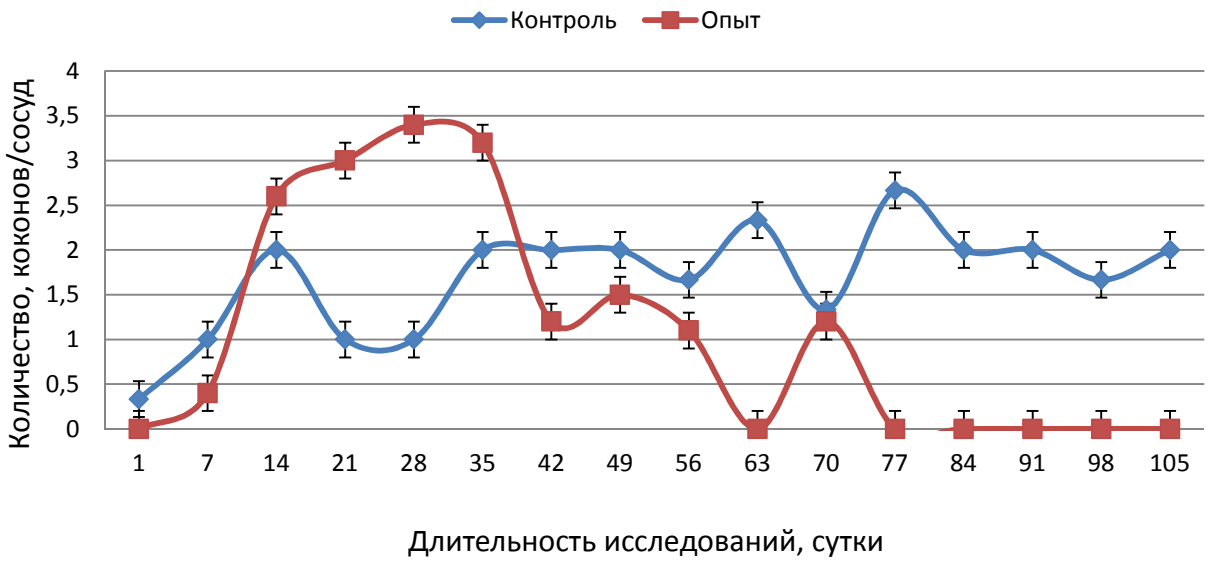

Рисунок 12 – Плодовитость *P. diplotetratheca* при наличии (опыт) и отсутствии поллютантов в почве (Среднее±ошибка)

Перед завершением опыта, наблюдалась тенденция к восстановлению плодовитости. Выплод ювенильных особей наблюдался начиная с середины эксперимента и до конца наблюдений, что статистически отличается ($p<0,05$) от показателя на загрязненных почвах.

С первых суток в присутствии поллютантов началось возрастание продуктивности, а ее пик пришелся на первую половину эксперимента. Через семь суток наблюдался спад, за которым следовало резкое снижение продуктивности в два раза. Далее, в середине эксперимента, наблюдались менее выраженные пики плодовитости, которые увеличили численность коконов в два раза. За общим повышением плодовитости следовал второй резкий спад, максимум которого пришелся на середину эксперимента, количество коконов при котором сократилось до нуля. В конце эксперимента наблюдались единичные случаи откладки коконов. В опыте с *P. diplotetratheca* на загрязненных почвах наблюдается схожая тенденция, что и с *L. rubellus*: максимальная откладка коконов предшествовала гибели люмбрицид.

Достоверные различия (p<0,05) наблюдаются в характере снижения численности червей в присутствии поллютантов перед пиками продуктивности. Для *P. diplotetratheca* было характерно плавное, а для *L. rubellus* – резкое снижение численности. Вторым достоверным различием (p<0,05) является наличие пиков разовой продуктивности. Для *L. rubellus* пик массовой продуктивности пришелся на первую половину эксперимента, а минимум откладки коконов наступил через 21 сутки и составил два кокона на половозрелую особь. Для *P. diplotetratheca* первый пик откладки коконов также пришелся на первую половину эксперимента, при этом средняя численность коконов была выше (p<0,05), чем в серии опытов с малым красным выползком, на 43%.

Серия пиков разовой продуктивности равнялась трем, в отличие от единичного пика *L. rubellus* для всех вариантов опыта. Данное явление, вероятно, говорит о больших «попытках» *P.diplotetratheca* восстановить численность. Тем не менее, наличие пиков продуктивности у обоих видов дождевых червей свидетельствует о проявлении механизма «омоложения» популяции (Исаев, Покаржевский, 1978; Безель, Оленев, 1989). Подобный механизм наблюдался у растений, а именно – в повышении семенной продуктивности в условиях загрязнения среды *Taraxacum officinale* (Жуйкова, 2002). Данные механизмы отмечены и среди животных, а именно – в увеличении плодовитости мышевидных в условиях повышенного загрязнения среды тяжелыми металлами и в условиях повышенного радиационного фона (Кудряшова с соавт., 2007). Авторами было отмечено, что при уменьшении числа неполовозрелых особей происходит компенсация – более интенсивное размножение особей, выживиших в условиях стрессового фактора (Жигальский, Бернштейн, 1990).

Выживаемость неполовозрелых особей. Как видно из рисунка 13, в выживаемости неполовозрелых особей *L. rubellus* наблюдаются похожие тенденции, что и в откладке коконов червями. На контроле, начиная с середины эксперимента, численность ювенильных особей упала в 1,4 раза (P<0,05), далее

последовал ступенчатый спад, который сократил численность ювенильных особей в 2 раза. К концу эксперимента, начиная с 84 дня исследований, численность стала восстанавливаться и составила 69%. Выживаемость неполовозрелых особей статистически разнится с данными, полученными на загрязненном субстрате (N = 2, df = 15) χ^2 = 27,69650, p = 0,03031.

Если сравнить данный показатель с показателем выживаемости половозрелых особей, то достоверные различия в тенденции изменения численности не выявлены. Снижение численности на контроле в начале эксперимента можно объяснить периодом, в котором вырабатывались приспособительные реакции к используемым стандартизированным условиям вермикультивирования.

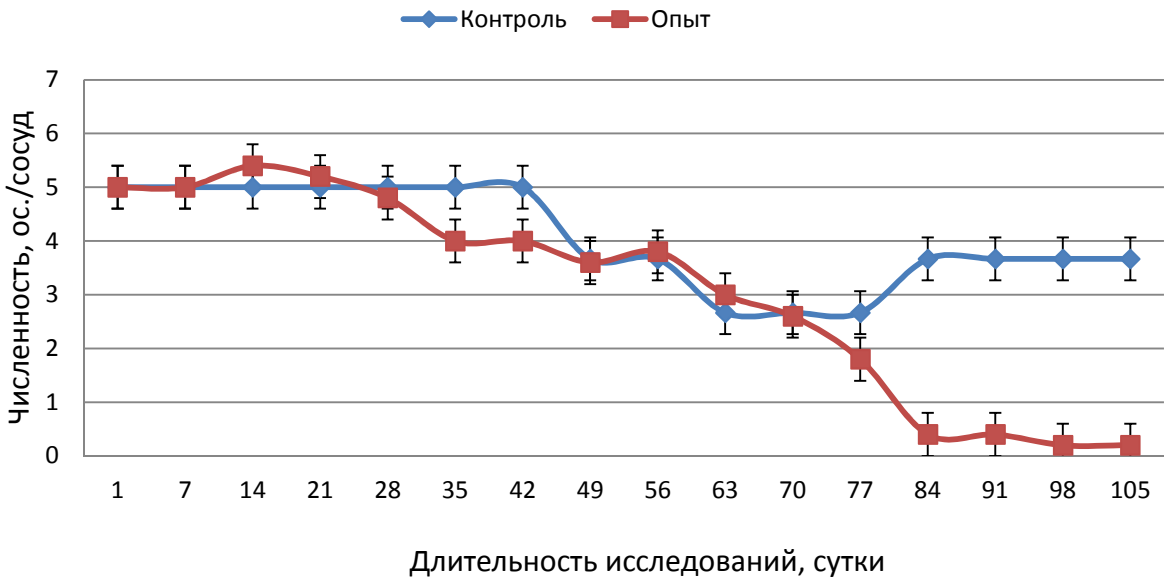

Рисунок 13 – Численность неполовозрелых особей *L. rubellus* при наличии и отсутствии полютантов в почве (Среднее±ошибка)

В присутствии поллютантов динамика выживаемости неполовозрелых люмбрицид почти равномерно снижается до нуля. Начиная со второй недели эксперимента наблюдался спад с незначительными повышениями, которые соответствовали продуктивности люмбрицид. Достоверные различия (p<0,05) в численности ювенильных особей наблюдались в середине эксперимента. В

конце эксперимента разница (p<0,05) между «контролем» и «опытом» стала более выраженной.

Рисунок 14 иллюстрирует выживаемость неполовозрелых особей *P. diplotetratheca,* в которой, как и в опыте с *L. rubellus*, наблюдаются похожие тенденции, что и в откладке коконов червями.

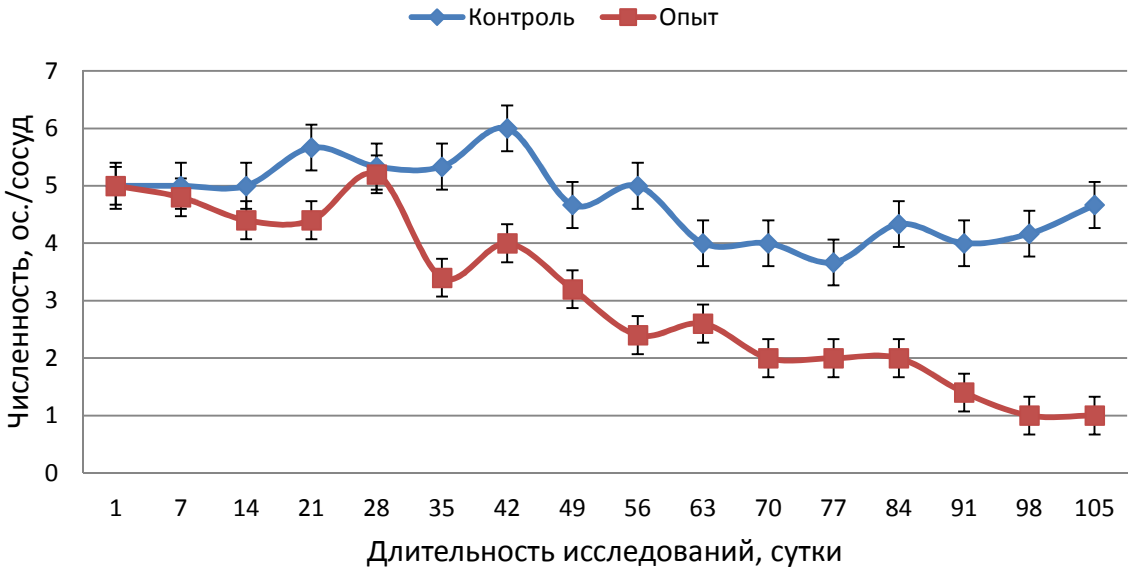

Рисунок 14 – Численность неполовозрелых особей *P. diplotetratheca* при наличии (опыт) и отсутствии поллютантов (контроль) в почве (Среднее±ошибка)

На контроле в начале эксперимента численность ювенильных особей была стабильной и равнялась 100% , далее, через неделю, численность особей увеличилась в 1,67 раза. После этого в течение двух суток наблюдался незначительный спад. Далее, в середине эксперимента, наблюдался пик выхода ювенильных особей из коконов, за которым следовало планомерное снижение численности, средняя численность составила 73%. К концу эксперимента численность стала восстанавливаться и составила 93% выживаемости неполовозрелых особей, что статистически различается (p<0,05) с данными, полученными на загрязненном субстрате. Сравнивая данный показатель с показателем выживаемости половозрелых особей, можно сказать, что наблюдаются различия (p<0,05) в тенденции изменения численности, которая

составляет 6,7%. Таким образом, в отличие от *L. rubellus*, где не наблюдалось достоверной разницы между количеством ювенильных и половозрелых особей на контроле, в опытах с *P. diplotetratheca*, существуют различия. Незначительное увеличение и далее снижение численности *P. diplotetratheca* на контроле в начале эксперимента можно объяснить использованием стандартизированных условий вермикультивирования, в которых вырабатывались приспособительные реакции. Постепенное увеличение численности в конце эксперимента, которое также описано и у *L. rubellus*, характеризуется оптимизацией плотности особей на ограниченной территории, в которых они выдерживались.

В присутствии поллютантов динамика выживаемости неполовозрелых особей *P. diplotetratheca* почти равномерно снижается до показателя, равного 1±0,2 ос./сосуд. По данным рангового анализа Фридмана, данная тенденция является достоверной (N = 2, df = 15) χ^2=28,83164, p = 0,03552. В первой половине эксперимента численность дождевых червей упала на 12%, и далее повысилась на 15% ($p<0,05$), что согласуется с пиком откладки коконов. Далее наблюдался спад на 32%, ему предшествовало незначительное повышение численности особей, которое соответствовало продуктивности люмбрицид. Достоверные различия ($p<0,01$) в численности ювенильных особей между «контролем» и «опытом» наблюдались в первой половине эксперимента, средняя численность составила 68% и сохранялись до конца эксперимента. Таким образом, в отличие от контрольных повторностей, в присутствии поллютантов достоверно уменьшился период выхода ювенильных особей из коконов на 7 суток ($p<0,05$). Данное значение является приблизительным, что связано с методом проведения эксперимента, в котором ручной разбор проходил 1 раз в неделю, для того чтобы минимизировать воздействие стрессового механического фактора для дождевых червей.

Таким образом, в выживаемости половозрелых и неполовозрелых особей *P. diplotetratheca* и *L. rubellus* наблюдаются схожие тенденции. В присутствии поллютантов численность особей снижалась до нуля. На контроле численность

люмбрицид снижалась незначительно. Ювенильные особи, как показали опыты, оказались более чувствительны к загрязнению почв.

В плодовитости у двух видов на загрязненной почве наблюдался разовый пик массовой откладки коконов, после чего данный показатель снизился до нуля. На контроле наблюдалось постепенное увеличение доли коконов с выходом из них ювенильных особей.

Возрастной спектр. На контроле наблюдается постепенное увеличение доли коконов (χ^2=9,7, p = 0,04), но в целом отмечается стабильный тип возрастного спектра (Рис. 15). Как мы отмечали выше, количество половозрелых и неполовозрелых особей остаётся постоянным, постепенно увеличивается доля коконов.

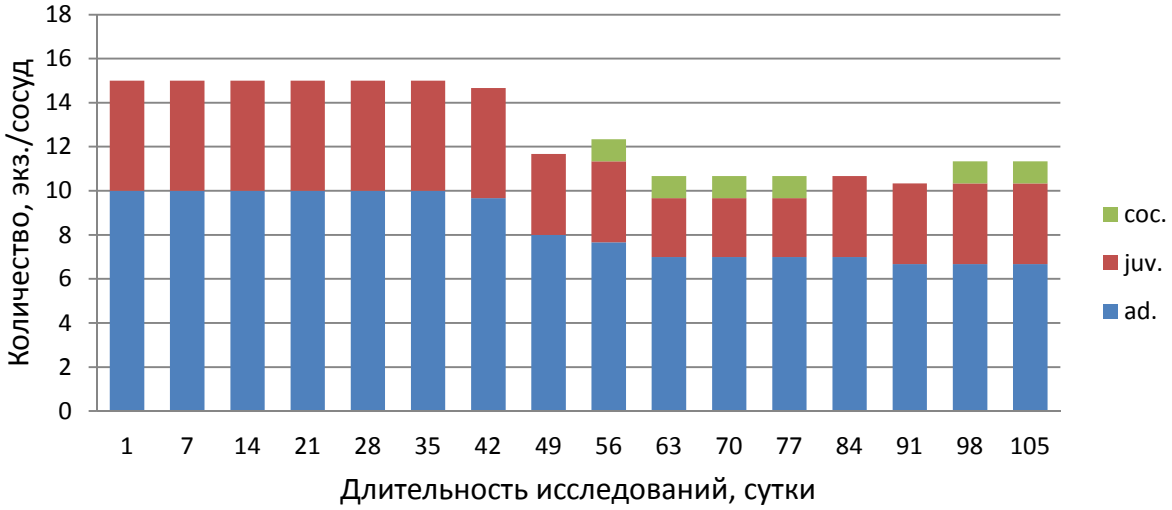

Рисунок 15 – Возрастной спектр *L. rubellus* при отсутствии полютантов в почве

При наличии поллютантов к концу эксперимента популяция состоит практически из одних половозрелых особей (Рис. 16). Это можно объяснить низкой выживаемостью неполовозрелых особей и небольшим выходом ювенильных червей из коконов. Статистически достоверное различие наблюдается во второй половине эксперимента для половозрелых особей (χ^2=11,1, p = 0,04.) и для неполовозрелых (χ^2=10,2, p = 0,03).

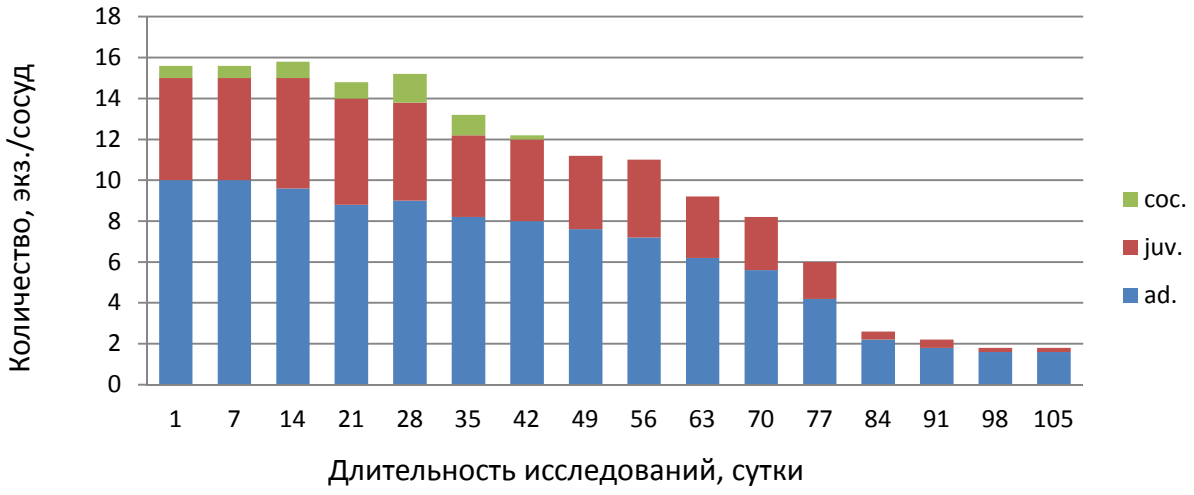

Рисунок 16 – Возрастной спектр *L. rubellus* при наличии поллютантов в почве

На контроле у вида *P. diplotetratheca* наблюдаются схожие тенденции с *L. rubellus*. Постепенное увеличение доли коконов обуславливает стабильный тип возрастного спектра. Как мы отмечали выше, процентное отношение неполовозрелых особей к половозрелым больше, чем таковое у *L. rubellus* (χ^2=7,1, p = 0,05).

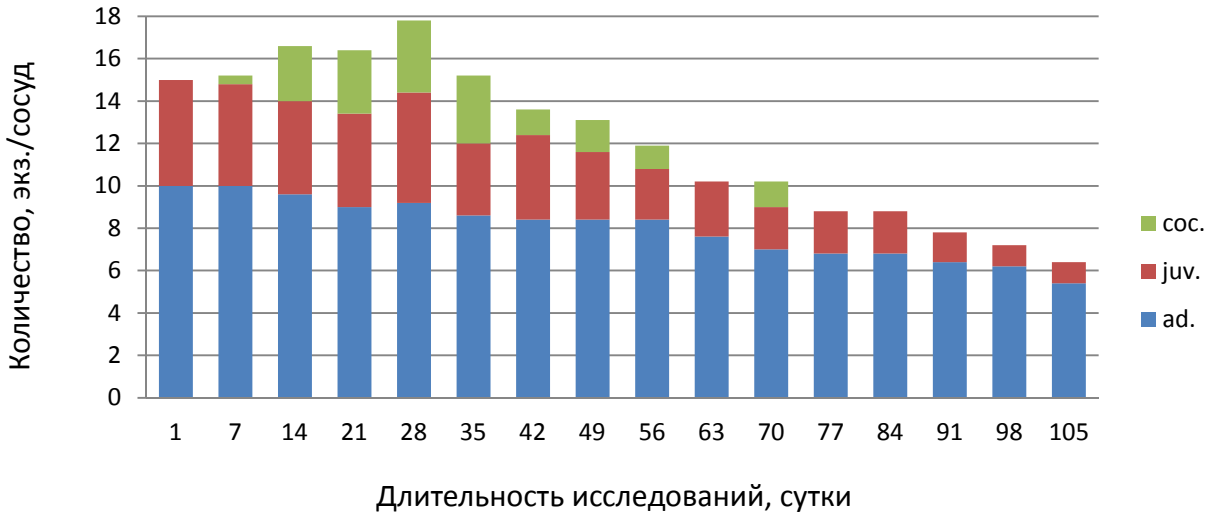

Рисунок 17 – Возрастной спектр *P. diplotetratheca* при наличии поллютантов в почве

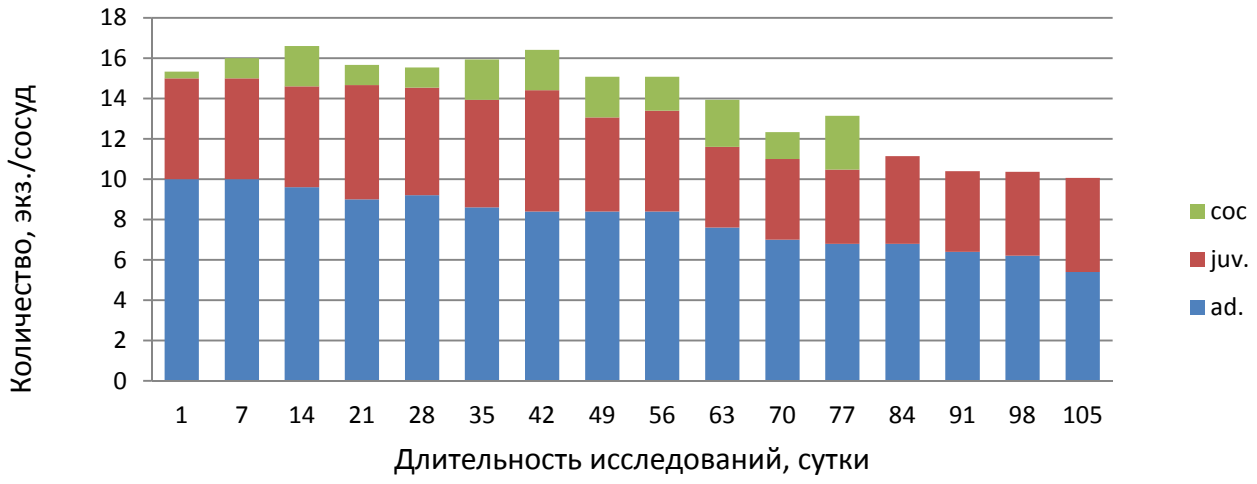

Рисунок 18 – Возрастной спектр *P. diplotetratheca* при отсутсвии поллютантов в почве

Вертикальное распределение половозрелых особей в субстрате. Как видно из рисунка 19, на контроле *L. rubellus* очень подвижны, поэтому обнаруживаются во всех слоях субстрата.

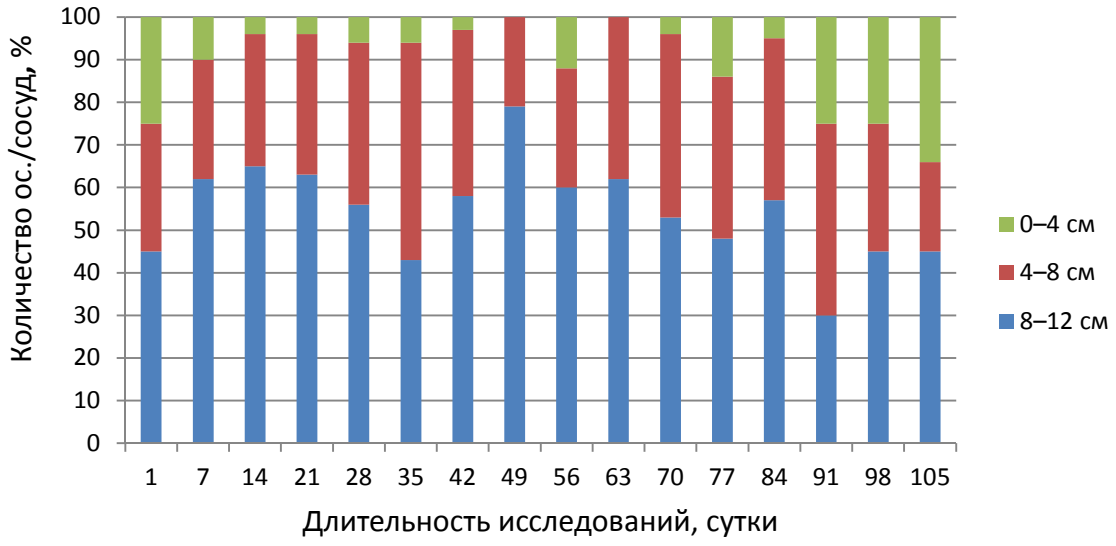

Рисунок 19 – Вертикальное распределение половозрелых особей *L. rubellus* отсутствии поллютантов в почве

На загрязнённой почве (Рис. 20) черви смещались в нижние ($p<0,05$) слои и отличались очень низкой активностью.

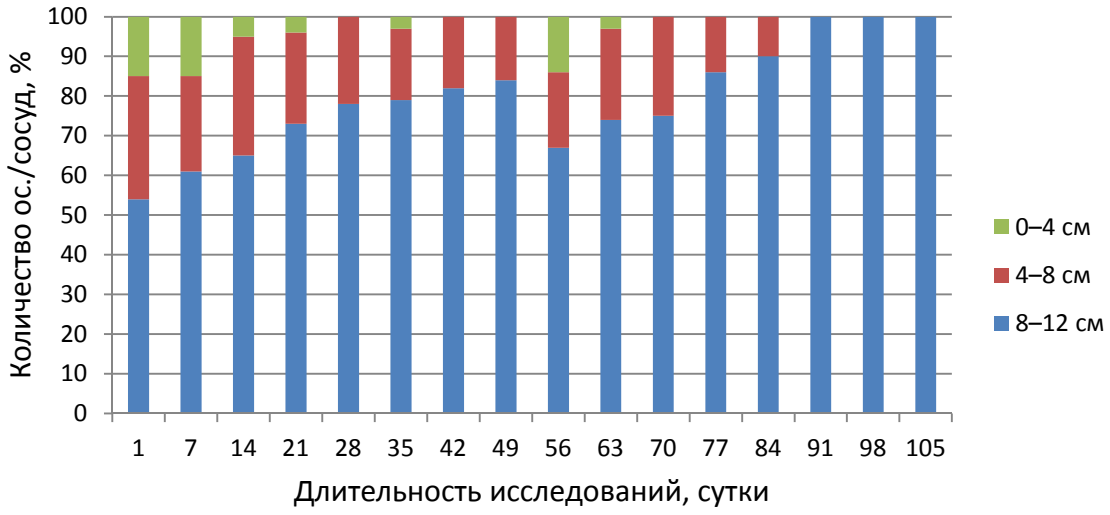

Рисунок 20 – Вертикальное распределение половозрелых особей *L. rubellus* при наличии поллютантов в почве

Для *P. diplotetratheca* характерны те же тенденции: на контроле черви данного вида отличаются высокой подвижностью, поэтому обнаруживаются во всех слоях субстрата. На загрязнённой почве черви смещались в нижние слои субстрата и отличались низкой активностью. Достоверное различие наблюдалось во второй половине эксперимента ($\chi^2=12,189$, $p = 0,042$).

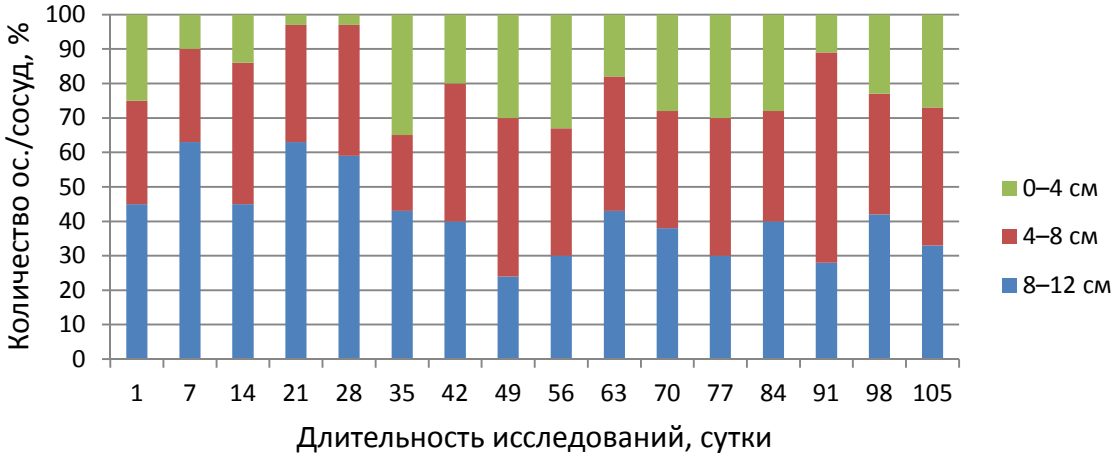

Рисунок 21 – Вертикальное распределение половозрелых особей *P. diplotetratheca* отсутствии поллютантов в почве

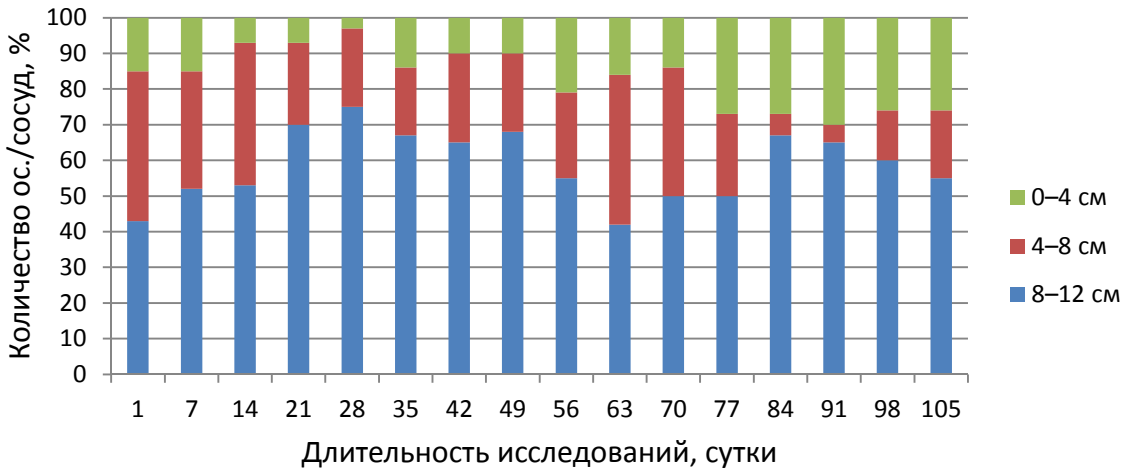

Рисунок 22 – Вертикальное распределение половозрелых особей *P. diplotetratheca* при наличии поллютантов в почве

В качестве экспресс-теста отдельно рассмотрены результаты *E. fetida*. Вид обитает на Среднем Урале, но не характерен для ельников-пихтарников, на которых располагались площадки исследований.

Выживаемость половозрелых особей. Как показано на рисунке 23, на контроле наблюдалась 70%-ая выживаемость особей.

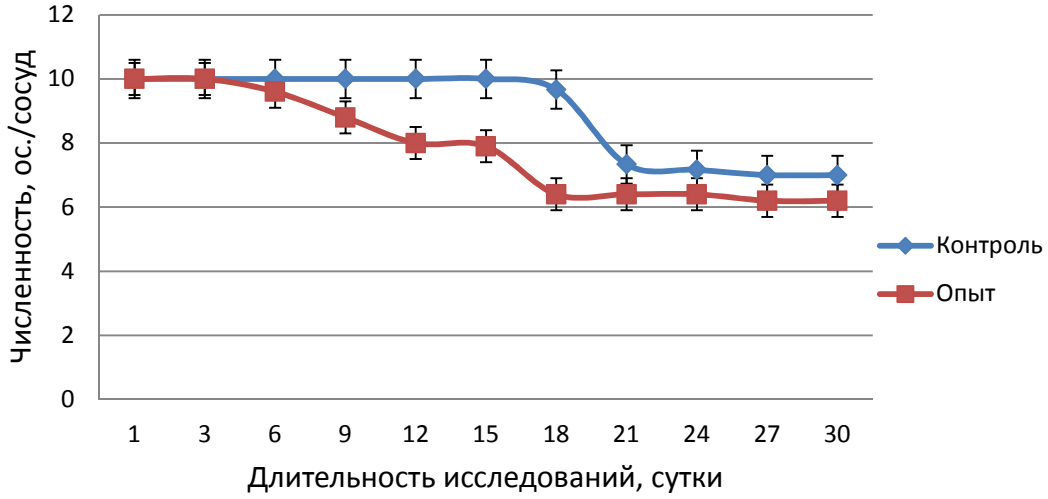

Рисунок 23 – Выживаемость половозрелых особей *E. fetida* при наличии и отсутствии поллютантов в почве (Среднее±ошибка)

В начале эксперимента произошло незначительное снижение численности половозрелых люмбрицид на 3,3%. Далее, в первой половине наблюдений, численность снизилась на 26,7% ($p<0,05$) и оставалась практически стабильной до конца эксперимента. Для дождевых червей данный показатель выживаемости на контрольных субстратах в ходе экпресс-теста на токсичность является относительно стабильным, что свидетельствует о хорошей приспособленности данного вида к условиям вермикультивирования. Незначительная элиминация дождевых червей на контроле может быть связана с отличиями режима вермикультивирования для данного вида и выбранными стандартизированными условиями среды, а также, в отличие от других видов дождевых червей, в непродолжительности проведения эксперимента.

При наличии поллютантов наблюдалось планомерное снижение численности, начиная с самого начала эксперимента, достоверные различия наблюдались в конце первой недели эксперимента ($p<0,05$). Далее отмечалась тенденция к снижению численности навозного червя, максимум которой наблюдался на шестнадцатые сутки и составил 64%.

Начиная со второй недели и до конца эксперимента, на загрязненных почвах начинается постепенная стабилизация численности люмбрицид. К концу эксперимента выживаемость половозрелых люмбрицид равнялась 62% ($p<0,05$). По данным рангового анализа Фридмана, данная тенденция является достоверной ($N = 2$, $df = 10$) $\chi^2=22,87375$, $p = 0,04561$. Также на загрязненных почвах наблюдалось более быстрое выхождение неполовозрелых особей из коконов, что способствовало стабилизации численности особей в сосудах, а следовательно, специфической реакции, характерной для *Eisenia fetida* (Savigny, 1926), которой не было отмечено у выше изученных видов.

Плодовитость. Для *E. fetida* в начале эксперимента в присутствии поллютантов наблюдался пик продуктивности, который продолжался до середины наблюдений и составил 0,23±0,11 кокона на половозрелую особь (Рис. 24).. Далее наблюдался второй пик продуктивности (0,27±0,05 кокона на особь), после пика плодовитость планомерно упала в 2 раза В отличие от

P. diplotetratheca и *L. rubellus,* график продуктивности навозного червя не соответствует графикам выживаемости вышеописанных половозрелых особей, где прослеживалась четкая тенденция массовой гибели люмбрицид, которой предшествовал разовый пик продуктивности во всех повторностях опыта. Также, в отличие от *P. diplotetratheca* и *L. rubellus,* не наблюдалось снижения продуктивности до 0 к концу эксперимента. Минимальное значение численности отмечалось на 24-27 сутки, что составило 0,03±0,01 кокона на особь.

К концу эксперимента в присутствии поллютантов численность коконов составила 0,2±0,04 ед. на особь. На контроле коконы появились в самом начале эксперимента, после чего наблюдалась стабильная откладка (2±0,07 кокона/сосуд), которая продолжалась около недели. Далее произошел выход люмбрицид из коконов с интервалом в восстановлении количества коконов в трое суток.

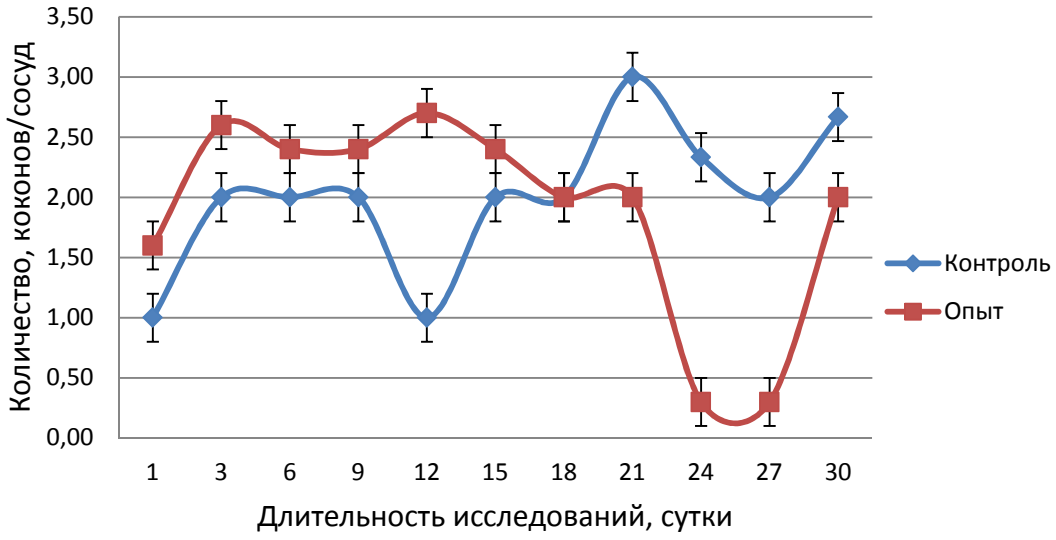

Рисунок 24 – Плодовитость *E. fetida* при наличии и отсутствии поллютантов в почве (Среднее±ошибка)

После восстановления количества коконов, на 21-е сутки наблюдался пик продуктивности, который увеличил количество коконов на 33%. За ним

следовал выход люмбрицид из коконов. К концу эксперимента индивидуальная плодовитость составила 0,27±0,08 кокона на особь.

Выживаемость неполовозрелых особей. В выживаемости неполовозрелых особей *Eisenia fetida* (Savigny, 1926) в присутствии поллютантов наблюдались отличия от реакции *L. rubellus* и *P. diplotetratheca*, которые характеризовались более быстрым созреванием и появлением пояска зрелости (Рис. 25).

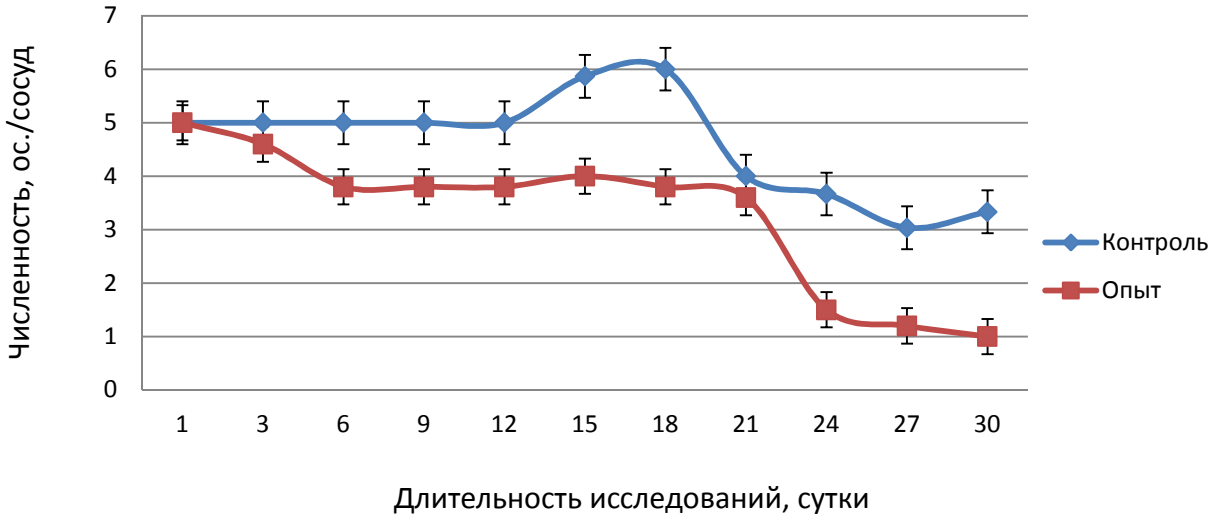

Рисунок 25 – Численность неполовозрелых особей *E. fetida* при наличии и отсутствии поллютантов в почве (Среднее±ошибка)

На загрязненных субстратах наблюдалось не только снижение численности люмбрицид, но и малый выход ювенильных особей, который не смог привести к стабилизации численности, в сравнении с вышеописанными видами. Вероятно, содержание токсикантов в субстрате равнялось или было больше показателя дозы-эффекта для данного вида. Снижение численности неполовозрелых особей наблюдалось на 1 сутки и продолжалось до 6 суток, где количество ювенильных особей равнялось 76%. К 21 суткам численность стабилизировалась и составляла 36%, после чего наступила резкая деградация численности ювенильных особей, и к концу эксперимента численность неполовозрелых особей практически равнялась 0.

На контроле в первой половине эксперимента численность ювенильных особей была стабильной и составляла 100%, далее наблюдалось

последовательное увеличение численности на 20%, что связано с выходом ювенильных особей из коконов. После этого наблюдался спад численности в 1,7 раза. В основном, численность уменьшилась за счет высокой смертности появившейся молоди. Минимальное значение наблюдалось в конце эксперимента и составило 60% от изначально заложенных особей. По данным рангового анализа Фридмана, данная тенденция является достоверной (N = 2, df = 10), χ^2=20,34765, p = 0,03764. В конце эксперимента, на 30-е сутки, средняя численность составила 3,33±0,21 особей на сосуд.

Возрастной спектр. На контроле наблюдается постепенное увеличение доли коконов, но в целом отмечается стабильный тип возрастного спектра (Рис. 26).

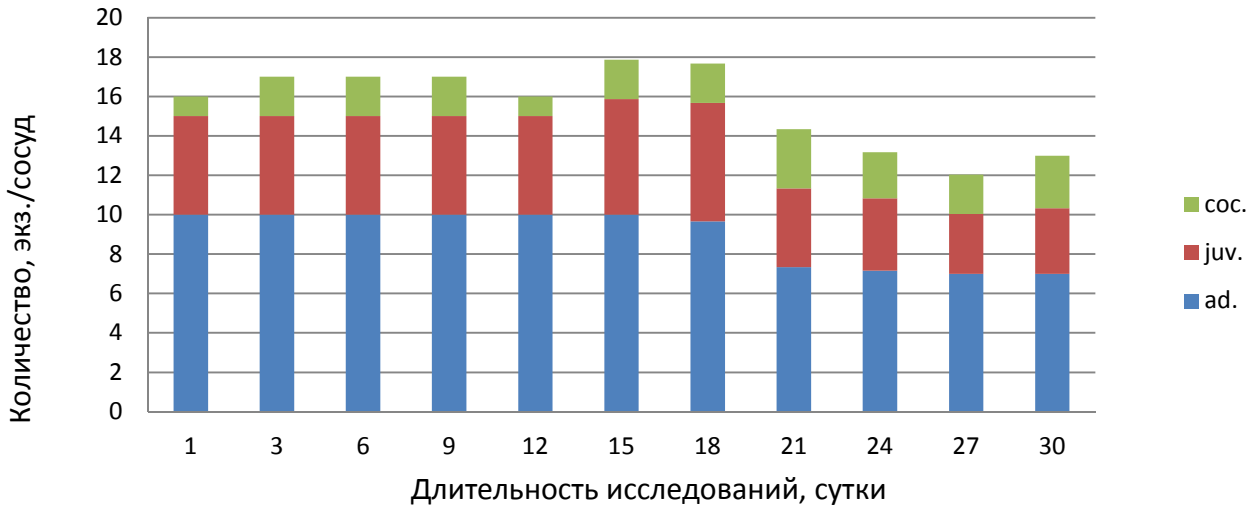

Рисунок 26 – Возрастной спектр *Eisenia fetida* при отсутствии поллютантов в почве

В присутствии поллютантов к концу эксперимента популяция на 65% состоит из половозрелых особей (Рис. 27). Это можно объяснить низкой выживаемостью неполовозрелых особей и небольшим выходом ювенильных червей из коконов. Данный показатель является характерной особенностью данного вида, в отличие от вышеописанных.

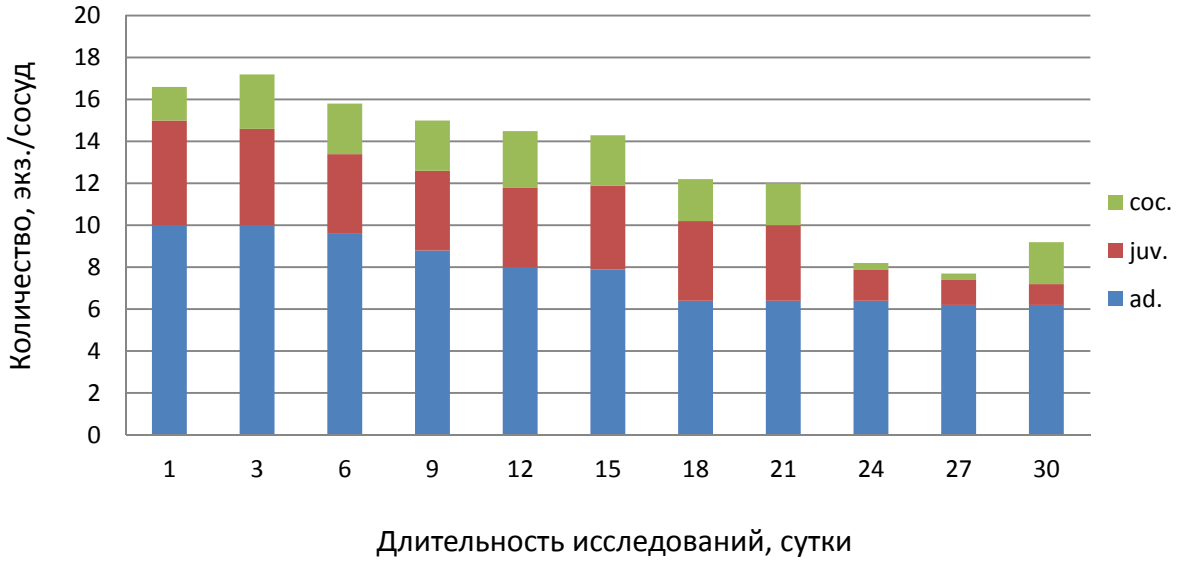

Рисунок 27 – Возрастной спектр *E.fetida* при наличии поллютантов в почве

Вертикальное распределение в субстрате. Как видно из рис. 28, на контроле *E.fetida* очень подвижны, поэтому обнаруживаются во всех слоях субстрата.

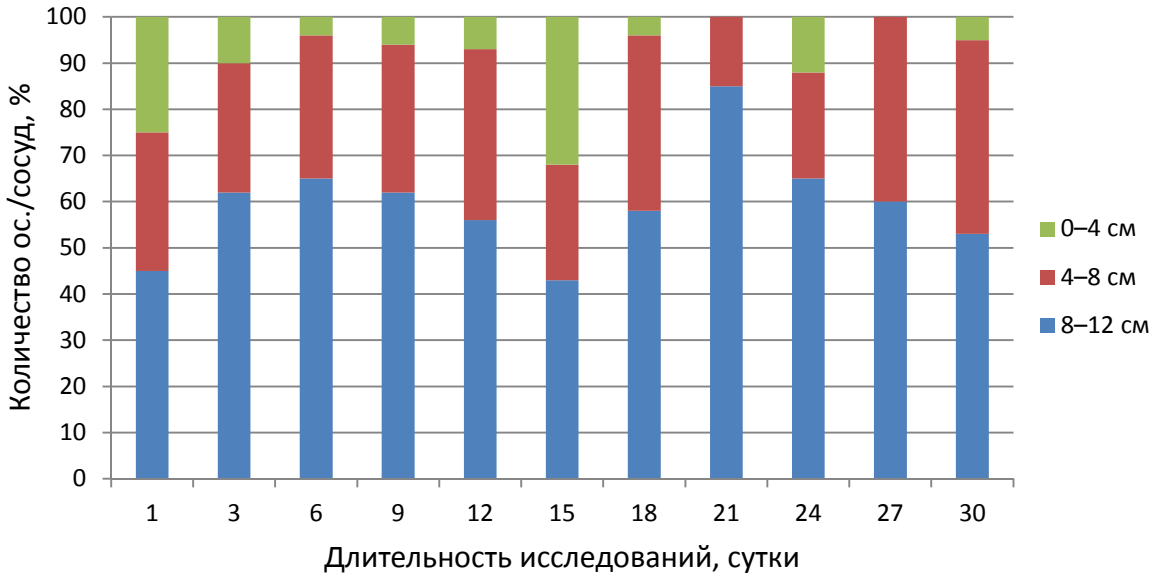

Рисунок 28 – Вертикальное распределение половозрелых особей *Eisenia fetida* при отсутствии поллютантов в почве

На загрязнённой почве (Рис. 29) черви смещались в нижние ($p<0,05$) слои и отличались средней активностью, в отличие от низкой активности *P. diplotetratheca* и *L. rubellus*. Показатель активности субъективен и говорит о скорости реакции, при которой люмбрициды, обладающие отрицательной фотореакцией, скрываются в нижние слои субстрата при ручной разборке повторностей.

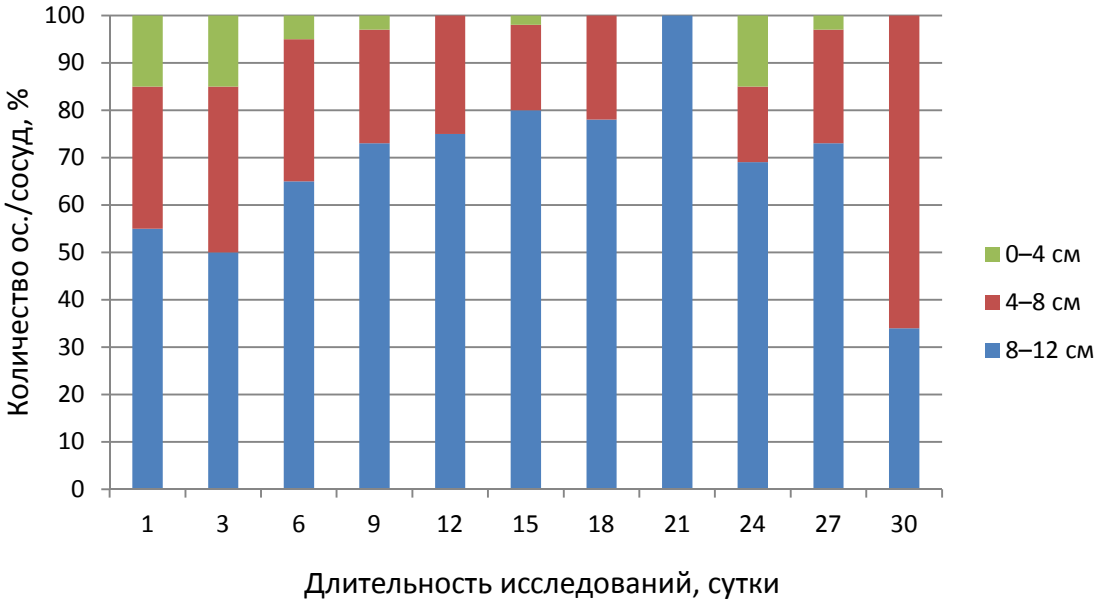

Рисунок 29 – Вертикальное распределение половозрелых особей *Eisenia fetida* при наличии поллютантов в почве

4.2. Сравнительный анализ методик очистки содержимого пищеварительного тракта дождевых червей для экотоксикологических исследований

Общепринятыми являются методики очистки кишечника, приведенные в методическом руководстве по исследованию структуры, функционированию и разнообразию детритных пищевых сетей под редакцией А.Д. Покаржевского, К.Б. Гонгальского и А.С. Зайцева (Покаржевский с соавт., 2003). Виды проанализированных нами методик описаны во второй главе.

После выдерживания люмбрицид на различных субстратах производили их вскрытие и вели учет на наличие остаточных включений.

На контроле содержание частиц составляет 26±8,3 ед. ($p<0,05$). Содержание частиц на субстрате с использованием агара с концентрацией сухого вещества от 3 до 4 г на литр однородно и составляет от 1,2±0,5 до 1,3±0,5 ед. При увеличении концентрации агара до 5 г/л наблюдается увеличение количества остаточных частиц в полости люмбрицид до 3,9±1,2 ($p<0,05$) единиц, что может быть связано с повышением густоты полученной смеси и затруднением перемещения червей во всем объеме субстрата. На измельченной и увлажненной фильтровальной бумаге показатель составил 2,3±1,1 ед. ($p<0,05$). Содержание остаточных включений является стабильным, но недостаточно удовлетворительным по количеству включений, к тому же необходимо уделить большее внимание чистоте субстрата. На сатурированной фильтровальной бумаге содержание остаточных частиц равно 1,2±0,2 ед. ($p<0,05$). Содержание остаточных частиц практически не различалось в эксперименте на сатурированной фильтровальной бумаге и на среде с концентрациями агара 3 г/л и 4 г/л ($p<0,05$).

Также важным показателем при оценке методик подобного рода является выживаемость люмбрицид на субстрате.

На агаре с концентрацией 2 г/л выживаемость люмбрицид составляла 67±13% ($p<0,05$). Из-за жидкого состояния агара субстрат проходил через желудочно-кишечный тракт неравномерно, местами задерживая большое количество остаточных частиц. При концентрации агара 3-4 г/л наблюдалась хорошая выживаемость люмбрицид и составляла 90±9% и 92±8% ($p<0,05$) соответственно. При увеличении концентрации агара до 5 г/л, проникновение в субстрат становится более затруднительным, что приводит к гибели люмбрицид, особенно ослабленных токсическим действием исследуемых веществ. Процент выживаемости составляет 64±12% ($p<0,05$). Очень важным фактором в данном случае является конечная вязкость полученного субстрата. Необходимо обращать внимание на назначение используемого сухого вещества

(типа агара-агара). Для достижения наилучших результатов по минимизации содержания частиц в пищеварительной системе дождевых червей с последующим анализом на тяжелые металлы лучше всего использовать микробиологический агар. Если пробоподготовка не требует химической чистоты, то можно использовать пищевой агар и т.п. Также важны условия хранения и фирма-производитель вещества. Таким образом, при приготовлении субстрата концентрацию сухого вещества можно менять, добиваясь такого состояния субстрата, чтобы люмбрициды могли с легкостью передвигаться в его толще. На сатурированной фильтровальной бумаге выживаемость люмбрицид составляет 91±9% ($p<0,05$), но к концу эксперимента дождевые черви выглядят очень ослабленными, с низкой двигательной активностью. На целлюлозе сохраняется масса и общая активность люмбрицид, в то время как на агаре наблюдается уменьшение массы на 17% ($p<0,05$), – возможно это связано с обезвоживанием организмов (Рис. 30)

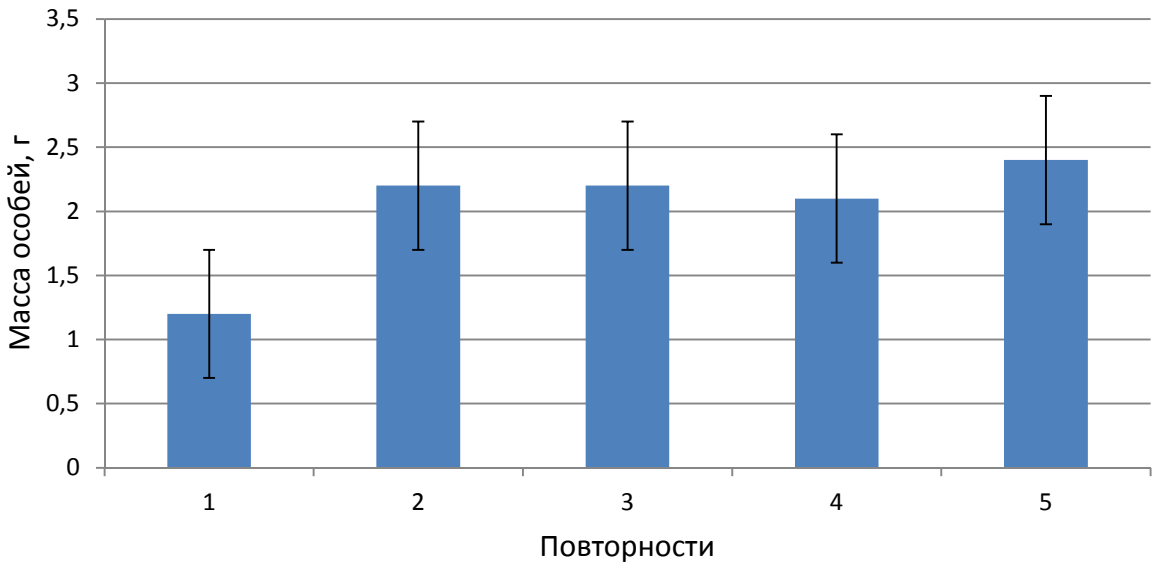

Рисунок 30 – Масса *E. fetida* при использовании агар-агара в качестве субстрата

В данном методе главным является оптимальное увлажнение, во избежание обезвоживания животных. Метод с использованием увлажненной целлюлозы оказался наилучшим по выживаемости люмбрицид 98±2% ($p<0,05$).

К концу эксперимента, визуально, дождевые черви проявляли высокую двигательную активность, были обнаружены 2 кокона, что свидетельствует о наиболее соответствующем физиологическим требованиям червей субстрате. В ситуациях, когда требуется долгая выдержка люмбрицид на чистом субстрате, этот метод наиболее приемлем.

4.3. Содержание тяжелых металлов в тканях дождевых червей, собранных на различном расстоянии от точечного источника эмиссии

Для упрощения интерпретации данных относительно токсической нагрузки среды использовался индекс токсичности K_i (Воробейчик с соавт., 1994) который был рассчитан для тяжелых металлов Cu, Cd, Zn, Pb.

Как видно из рисунка 31, индекс токсичности тем выше, чем ближе расстояние к источнику эмиссии, больше всего индекс токсичности наблюдается у свинца и кадмия ($p<0,05$).

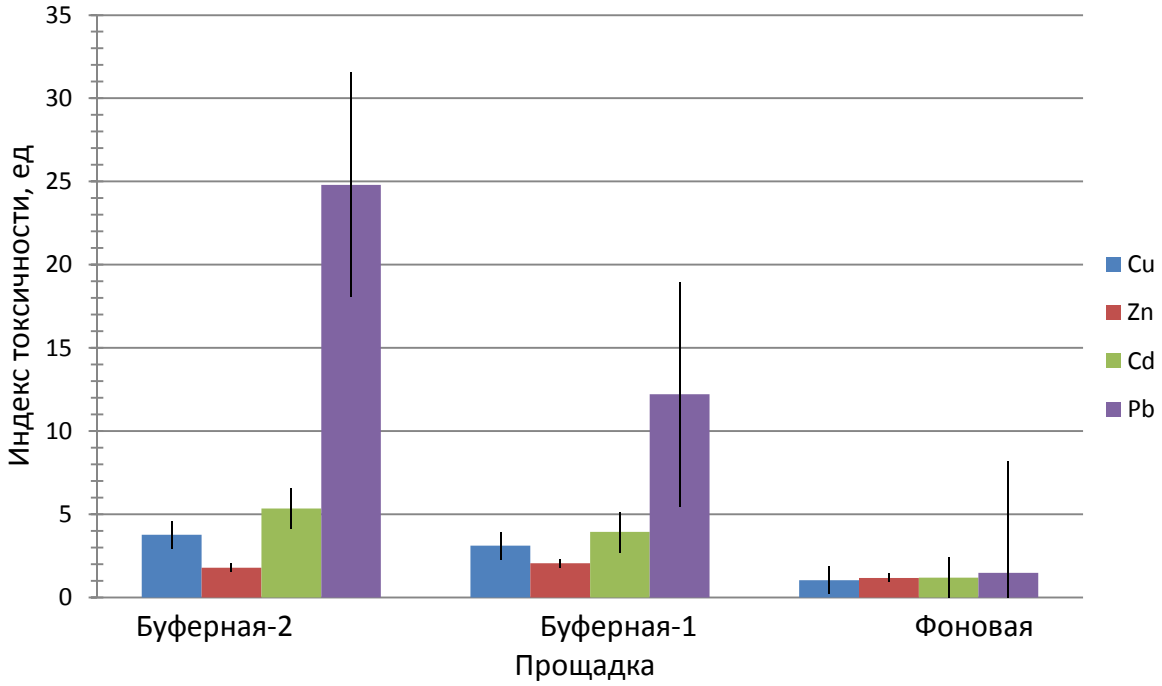

Рисунок 31 – Индекс токсичности в зависимости от расстояния от источника эмиссии поллютантов (Среднее±ошибка)

Для меди, цинка и кадмия характерно прямое накопление в тканях люмбрицид (Табл. 5). Чем выше их концентрация в почве, тем выше концентрация в тканях дождевых червей.

Таблица 5 – Концентрации (мкг/г) тяжелых металлов в дождевых червях на разном удалении от СУМЗа

Элемент	Расстояние до источника выбросов, км			
	30 [n=55]	20 [n=47]	7 [n=38]	4–5 [n=57]
Cu	7,5±0,1 {9,9} (5,6–10,3)	7,9±0,2 {17,4} (5,3–11,1)	23,7±1,7 {44,2}*** (11,9–71,7)	28,5±1,9 {50,3}*** (10,3–75,4)
Pb	9,2±0,7 {56,4} (1,0–26,7)	14,1±1,5 {72,9} (3,1–62,6)	112,5±13,6 {74,5}*** (18,3–359,5)	228,3±25,1 {83,0}*** (8,6–1010,3)
Cd	16,8±0,7 {30,9} (6,6–28,8)	21,3±0,9 {29,0}** (9,7–35,8)	67,7±3,8 {34,6}*** (24,8–131,9)	91,9±4,8 {39,4}*** (28,3–193,3)
Zn	299,6±10,1 {25,0} (143,6–439,6)	356,8±14,8 {28,4} (193,6–705,9)	617,8±36,3 {36,2}*** (230,2–1365,3)	536,6±30,7 {43,2}*** (185,6–1152,4)

Примечание: среднее ± ошибка, в круглых скобках – минимальное и максимальное значение, в фигурных скобках – коэффициент вариации, учетная единица – особь. Уровень значимости различий с 30 км: * – $p<0,05$, ** – $p<0,01$, *** – $p<0,001$ (критерий Шеффе).

Для накопления цинка (Табл. 6) показатель силы влияния оказался низким и недостоверным. С приближением к источнику эмиссии однофакторный дисперсионный анализ показал снижение силы влияния

концентрации поллютантов на накопление. Возможно, это говорит о границе накопления, за которой следует летальный исход червей.

Таблица 6 – Зависимость накопления тяжелых металлов в тканях *P. diplotetratheca* от концентрации тяжелых металлов в почве

Металлы	**$\eta^2_x \pm m$**	**F**	**k-n**	**α**
Cu	0,75±0,02	20.63	1; 62	0,05
Pb	0,35±0,07	14.25	1; 62	0,01
Cd	0,55±0,05	16.25	1; 46	0,05
Zn	0,33±0,25	(2.97)	1; 46	-

Примечание: **$\eta^2_x \pm m$** показатель силы влияния ± ошибка, F – достоверность по Фишеру, в круглых скобках – показатель F<Fтаб, k-n – число степеней свободы, α – уровень значимости исследований.

В накоплении цинка, кадмия, свинца существует достоверная разница ($p<0,05$), зависящая от возраста особей. В ювенильных особях содержание металлов меньше, чем в половозрелых, что можно объяснить меньшим временем нахождениея неполовозрелых люмбрицид в загрязненной зоне или более быстрым обменом веществ. В накоплении меди между половозрелыми и ювенильными особями разница не выявлена.

Таким образом, концентрации меди, цинка и кадмия в особях *P. diplotetratheca* соотносятся с литературными данными других авторов, однако концентрация свинца выше ожидаемой для имеющегося уровня загрязнения (Ma, 1987; Dai et al., 2004; Veltman et al., 2007). Если сравнивать аккумуляцию тяжелых металлов с данным показателем других представителей мезофауны, которые обитают в районе Среднеуральского медеплавильного завода, в люмбрицидах содержатся значительные концентрации Pb и Cd даже в

сравнении со значениями на буферной территории, только моллюски могут соответствовать данному показателю (Безель и др., 2006).

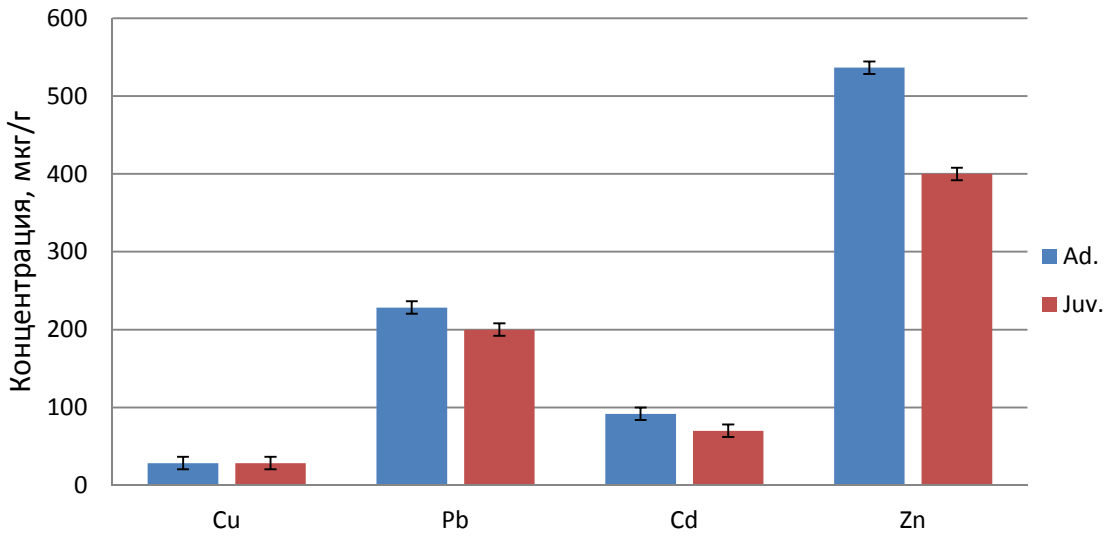

Рисунок 32 – Накопление тяжелых металлов (Cu, Zn, Cd, Pb) в ювенильных и половозрелых особях *P.diplotetratheca* (Среднее±ошибка)

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

За время проведения работ нами было обнаружено девять видов дождевых червей, из которых два вида – эндемики Среднего Урала, один вид, распространен на территории Сибири и Дальнего Востока. Большую часть видов составили виды – космополиты. Распространение данных видов можно объяснить их широким кругом приспособлений к меняющимся климатическим факторам и воздействию антропической нагрузки. Данные касающиеся преобладания видов (в частности, доминирование *P. diplotetratheca*), сходятся с исследованиями других авторов для данной территории (Коробейников, 1978; Воробейчик, 1998, Воробейчик с соавт., 2007). Постепенное снижение численности люмбрицид всех видов в зоне токсической нагрузки дает право рассматривать их как довольно однородную экологическую группу. Наше предположение подтверждается выводами Е. Л. Воробейчика (1998) и не соответствует данным других авторов, которые выявили закономерности в видоспецифичной реакции люмбрицид на увеличение концентрации тяжелых металлов в почве в естественных условиях (Spurgeon, Hopkin, 1996; Langdon et al., 2005).

Отмеченная численность люмбрицид на фоновой территории превышает данные Т.С. Перель (1979). Вероятнее всего, это связано со временем проведения исследований и климатическими условиями, которые были характерны для данной местности. За полевой сезон 2013 года, который длился с мая по сентябрь, наибольшее количество осадков выпало в июле, что привело к особому обилию червей. После обильных осадков в августе было засушливо, в результате чего люмбрициды на фоновой территории обнаруживались лишь в нижних слоях почвы и в низинах. Второй причиной такой высокой численности, вероятно, можно считать учет всех возрастных состояний (половозрелых, неполовозрелых особей и коконов).

При уменьшении расстояния до источника эмиссии количество дождевых червей резко сокращается, что является следствием увеличения токсической

нагрузки на данную территорию, которую можно проследить в увеличении концентрации тяжелых металлов и понижении pH в почве и подстилке. Люмбрициды не были обнаружены на территории ближе пяти километров от завода.

По отношению к фоновой территории, при приближении к импакту, достоверно снижается ($p<0,05$) количество коконов люмбрицид с 536.2± 110.5 до 180± 92.6. Наблюдение можно объяснить снижением общей численности червей, а также снижением плодовитости дождевых червей на фоне постоянного химического «стресса».

Исходя из качественных и количественных характеристик популяции, люмбрициды были классифицированы по морфо-экологическим типам. Выявлена закономерность, связанная с уменьшением расстояния до Среднеуральского медеплавильного завода и увеличением процесса элиминации видов дождевых червей, которые питаются собственно перегноем. Таким образом, данный факт свидетельствует об узкой экологической валентности червей второго морфо-экологического типа к загрязнению окружающей среды. С приближением к заводу, достоверно увеличивается ($p<0,05$) количество подстилочных и почвенно-подстилочных видов и уменьшается доля почвенных видов, относящихся к первому морфо-экологическому типу. Вероятнее всего, наличие мощной подстилки и практически полное отсутствие гумусового (маломощного) слоя является лимитирующим фактором для люмбрицид, которые относятся к «вторичным гумусообразователям», питающимся детритом, находящимся собственно в почве.

Изменения численности, качественного состава и распределения дождевых червей в субстрате подтверждают ранее описанные закономерности, которые были обнаружены для данных территорий (Воробейчик и др., 2011). Дождевые черви в зоне воздействия поллютантов характеризуются меньшими размерами как по длине, так и по ширине особей. По всей видимости, тяжёлые металлы в комплексе с подкислением почвы вызывают угнетение роста и

развития организмов первой группы реакции на поллютанты (Воробейчик с соавт., 2007). При этом наблюдается разброс данных в пределах буфера (5 и 7 км) и контроля (20 и 30 км). При уменьшении расстояния до точечного источника эмиссии до 4 и менее км, количественные показатели снижались практически до нуля. По отношению к вертикальному распространению в субстрате, люмбрициды перемещаются в верхние горизонты. Данное явление можно связать с элиминацией второго морфо-экологического типа и распределением дождевых червей, которые являются вторичными деструкторами растительных остатков, в верхние горизонты. Например, виды *D. octaedra* и *L. rubellus* – представители первого морфо-экологического типа, были встречены в почве лишь на 30 км, при уменьшении расстояния до завода они полностью сместились в подстилку. Вероятно, это связано не только с токсической нагрузкой, но и со структурой почвенных горизонтов, в которых обитают люмбрициды.

В лабораторных условиях отмечаются те же самые тенденции, что и при изучении люмбрицид в полевых условиях: наличие поллютантов способствует снижению выживаемости люмбрицид (Fitzpatrick et al., 1996; Neuhauser et al., 1985; Spurgeon, Hopkin, 1995; Spurgeon et al., 2005, 2006), уменьшению продуктивности. При этом в фиксированных условиях окружающей среды наблюдается смещение дождевых червей в нижние слои субстрата.

Загрязнение резко увеличивает концентрацию микроэлементов в телах червей – фактически на порядок, а иногда и на порядки. Чем выше концентрация тяжелых металлов в субстрате, тем выше содержание тяжелых металлов в тканях люмбрицид. Авторы отмечают, что в первую очередь это касается свинца и кадмия (Lock, Janssen, 2001a, 2001b; Ma et al, 2002), так же это подтверждают наши исследования.

Данные, касающиеся большей чувствительности ювенильных особей в сравнении с половозрелыми, подтверждает лабораторный опыт. На контроле наблюдается постепенное увеличение доли коконов, но в целом отмечается стабильный тип возрастного спектра. Количество половозрелых и

неполовозрелых особей остаётся постоянным, постепенно увеличивается обилие коконов. При наличии поллютантов в почве к концу эксперимента популяция состоит практически из одних половозрелых особей. Это можно объяснить низкой выживаемостью неполовозрелых особей и небольшим выходом ювенильных червей из коконов. В присутствии поллютантов наблюдался пик продуктивности, далее плодовитость упала до 0, это предшествовало массовой гибели дождевых червей. Возможно, это защитный биологический механизм, дающий популяции шанс выжить в неблагоприятных условиях. В экотоксикологии популяций этот эффект условно был назван эффектом «омоложения» популяции (Безель, 2006).

Данные, полученные нами при измерении концентрации тяжелых металлов в дождевых червях, не совпадают с исследованиями Бенгсона с соавт. Он отмечает, что ювенильные черви аккумулируют металлы в больших количествах, чем взрослые, однако они не выживают при концентрации меди – 500 мкг/г, кадмия – 100 мкг/г, при pH 5,5 и свинца – 500 мкг/г, при pH 6,5 (Bengtsson et al., 1983). Данный факт можно объяснить повышенным уровнем метаболизма неполовозрелых особей, однако при увеличении концентрации поллютантов свыше концентрации «доза – эффект», организм червей не справляется с детоксикацией, что и приводит к гибели.

Нами установлена достоверная разница в накоплении цинка, кадмия, свинца, зависящая от возрастного состояния люмбрицид. Это является очевидным фактом, поскольку тяжелые металлы обладают кумулятивным эффектом: чем дольше организм находится в зоне токсической нагрузки, получая тяжелые металлы с пищей, тем большая концентрация будет обнаруживаться в тканях организма. Наши данные подтверждаются рядом работ других авторов, которые отмечают ту же закономерность (Marino, Morgan, 1999; Conder, Lanno, 2000; Davies et al., 2003). В ювенильных особях содержание металлов меньше, чем в половозрелых, что можно объяснить меньшим временем нахождения неполовозрелых люмбрицид на загрязненной территории.

По видоспецифичности сравнительно быстрый результат был получен при изучении вида *L. rubellus,* который предлагаем использовать для длительных наблюдений в опытах. Для экспресс-тестов, из-за доступности в нахождении, предлагаем использовать *E. fetida*.

Методика эвакуации содержимого желудка дождевых червей с помощью агар-агара может быть использована для пробоподготовки дождевых червей к анализу на тяжелые металлы.

Метод эвакуации содержимого желудка дождевых червей с помощью измельченной целлюлозы предлагаем использовать в ситуациях, когда требуется долгая выдержка люмбрицид на чистом субстрате или при моделировании субстрата с внесением различных концентраций поллютантов в искусственных условиях, для создания систем нормирования окружающей среды.

Исходя из того, что дождевые черви оказались чувствительны к различным поллютантам по таким параметрам, как возрастная структура и размножение, **дальнейшее развитие темы** будет заключаться в разработке методик биотестирования, включающих репродуктивный и половозрастной компоненты. Кроме вышепредставленных данных по накоплению тяжелых металлов в тканях люмбрицид, предполагается изучение кинетики накопления тяжелых металлов различными видами дождевых червей с учетом морфо-экологической типизации.

По результатам исследования сделаны следующие **выводы:**

1. Видовое богатство дождевых червей представлено девятью видами, два из которых – эндемики Среднего Урала. На всей исследуемой территории доминантом является вид *P. diplotetratheca*. При приближении к СУМЗу наблюдается снижение видового богатства с 7 видов на фоновой территории до 3 видов на буферной.
2. Дождевые черви в зоне воздействия поллютантов характеризуются меньшими размерами и массой (сухой вес). При приближении к заводу

наблюдаются общие тенденции в снижении числа видов, численности и количества откладываемых коконов дождевых червей.

3. В лабораторных условиях установлено, что присутствие поллютантов в субстрате способствует гибели дождевых червей ($p<0,05$). Перед этим провоцируется разовая откладка коконов люмбрицид. На контроле к концу эксперимента наблюдается стационарный тип возрастной структуры, на загрязненной почве регрессивный. Присутствие загрязняющих веществ в субстрате способствовало уменьшению подвижности дождевых червей.

4. Наиболее эффективной является методика эвакуации содержимого пищеварительного тракта дождевых червей с использованием агар-агара с концентрацией 3-4 г/л.

5. Чем ближе расстояние до источника эмиссии, тем выше концентрация тяжелых металлов в тканях дождевых червей. Накапливаются преимущественно свинец и цинк, в меньшей степени медь и кадмий.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ И ЛИТЕРАТУРЫ

1. Балуев В. К. Дождевые черви основных почвенных разностей Ивановской области / В. К. Балуев // Почвоведение. – 1950. – № 4. – С. 219–227.

2. Безель В. С. Экологическая токсикология: популяционный и биоценотический аспекты / Под ред. Е. Л. Воробейчика. – Екатеринбург: «Гощицкий», 2006. – 280 с.

3. Безель В. С. Внутрипопуляционная структура грызунов в условиях техногенного загрязнения среды обитания / В. С. Безель, Г. В. Оленев // Экология. – 1989. – № 3. – С. 40–45.

4. Берман Д. И. Распространение дождевого червя *Dendrobaena octaedra* (Lumbricidae: Oligochaeta) на севере Голарктики ограничено недостаточной морозостойкостью/ Д. И. Берман, Е. Н. Мещерякова, А. В. Алфимов, А. Н. Лейрих // Зоол. журн. – 2002. – Т. 81, № 10. – С. 1210–1221.

5. Бессолицына Е. П. Структура мезонаселения почв подтаёжного ландшафта и её изменение в условиях техногенного воздействия / Е.П. Бессолицына // Проблемы почвенной зоологии: Матер. докл. 9 Всесоюз. совещ. – Тбилиси, 1987. – С. 35–37.

6. Богач Я. Животные – биоиндикаторы индустриальных загрязнений / Я. Богач, Ф. Седлачек, Д. А. Криволуцкий // Журнал общей биологии. – 1988. – Т. 49. – № 5. – С. 630– 635.

7. Большаков В. Н. Специфика формирования видовых сообществ животных в техногенных и урбанизированных ландшафтах / В. Н. Большаков, О. А. Пястолова, В. Л. Вершинин // Экология. – 2001. – № 5. – С. 343–354.

8. Бызова Ю. Б. Температурные условия обитания и интенсивность газообмена почвенных беспозвоночных / Ю. Б. Бызова // Адаптация почвенных животных к условиям среды. – М.: Наука. 1977. – С. 3–44.

9. Викторов А. Г. Разнообразие полиплоидных рас в семействе дождевых червей Lumbricidae / А. Г. Викторов // Успехи современной биологии. – 1993. – Вып. 3. – С. 304–312.

10. Водяницкий Ю. Н. Изучение тяжелых металлов в почвах. – М.: Почв. ин-т им. В. В.Докучаева, 2005. – 109 с.

11. Воробейчик Е. Л. Реакция лесной подстилки и ее связь с почвенной биотой при токсическом загрязнении / Е. Л. Воробейчик // Лесоведение. – 2003. – № 2. – С. 32–42.

12. Воробейчик Е. Л. Реакция почвенной мезофауны на выбросы Среднеуральского медеплавильного комбината / Е. Л. Воробейчик, М. Е. Гребенников, А. И. Ермаков и др. // Биологическая рекультивация и мониторинг нарушенных земель. – Екатеринбург. – 2007. – С. 128–148.

13. Воробейчик Е. Л. Изменение животного населения почвы под действием выбросов медеплавильного комбината / Е. Л. Воробейчик // Проблемы почвенной зоологии: Матер. докл. 10 Всесоюз. совещ. – Новосибирск, – 1991. – С. 225.

14. Воробейчик Е. Л. Изменение населения педобионтов под действием выбросов крупного химического производства / Е. Л. Воробейчик // Животный мир Южного Урала. – 1990. – С. 9–11.

15. Воробейчик Е. Л. Популяции дождевых червей (Lumbricidae) лесов Среднего Урала в условиях загрязнения выбросами медеплавильных комбинатов / Е. Л. Воробейчик // Экология. – 1998. – № 2. – С. 102–109.

16. Воробейчик Е. Л. Экологическое нормирование техногенных загрязнений / Е. Л. Воробейчик, О. Ф. Садыков, М. Г. Фарафонтов – Екатеринбург: УИФ «Наука», 1994. – 280 с.

17. Воробейчик Е. Л. Измененние разнообразия почвенной мезофауны в градиенте промышленного загрязнения / Е. Л. Воробейчик, А. И. Ермаков, М. П. Золотарев, Т. К. Тунева // RussianEnt. J. – 2012. – № 21. – С. 203–218.

18. Всеволодова-Перель Т. С. Дождевые черви фауны России. Кадастр и определитель / Т. С. Всеволодова-Перель – М.: Наука, 1997. – 101 с.

19. Гиляров М. С. Почвенные беспозвоночные как объект экологического мониторинга / М. С. Гиляров, А. Д. Покаржевский // Охраняемые природные территории. – М.: Центр международных проектов ГКНТ, 1983. – С. 108–115.

20. Гиляров М. С. Почвенные беспозвоночные как показатели почвенного режима / М. С. Гиляров // Биологические методы оценки природной среды. – М.: Наука, 1978. – С. 78–90.

21. Догель В. А. Зоология беспозвоночных / В. А. Догель – М.: Высшая школа, 1981. – 608 с.

22. Дончева А. В. Оценка поступления тяжёлых металлов в ландшафт / А. В. Дончева, Л. К. Казаков, В. Н. Калуцков // Химия в сельском хозяйстве. – 1982. – Т. 20, № 3. – С. 8–10.

23. Евгеньев М. И. Тест методы и экология / М. И. Евгеньев // Соросовский Образовательный Журнал. – 1999. – № 11. – С. 29–35.

24. Елпатьевский П. В. Почвенная мезофауна в аномальных эколого-геохимических условиях / П. В. Елпатьевский, Л. Д. Филатова // География и промышленные ресурсы. – 1988. – № 1. – С. 92–97.

25. Жигальский О. А. Оценка влияния внутрипопуляционных и внешних факторов на динамику рыжей полевки /О. А. Жигальский, А. Д. Бернштейн // Журн. общ. биологии. – 1990. – Т. 51, №4. – С. 469–475.

26. Жуйкова Т. В. Репродуктивные возможности растений в градиенте химического загрязнения среды / Т. В. Жуйкова, В. С. Безель, В.Н. Позолотина, О. А. Северюхина// Экология. – 2002. – № 6. – С. 432–437.

27. Зайцев Г. Н. Математический анализ биологических данных / Г. Н. Зайцев – М.: Наука, 1991. – 184 с.

28. Исаев С. И. Рост и половое созревание лесных мышей при повышенном содержании 90Sr в биогеоценозе / С. И. Исаев, А. Д. Покаржевский // Экология. – 1978. – № 3. – С. 64–68.

29. Кайгородова С. Ю. Трансформация некоторых свойств серых лесных почв под действием выбросов медеплавильного комбината / С. Ю. Кайгородова, Е. Л. Воробейчик // Экология. – 1996. – № 3. – С. 187–193.

30. Ковальчук Л. А. Тяжёлые металлы в окружающей среде Среднего Урала и их влияние на организм / Л. А. Ковальчук, О. А. Сатонкина, А. Э. Тарханова // Экология. – 2002. – № 5. – С. 358–361.

31. Колеватова А. И. Термические адаптации у дождевых червей / А. И. Колеватова // Биология и промысел охотничьих животных. Сборник научных трудов. – Пермь, 1983. – С. 41–46.

32. Королёва Е. Г. Почвенно-зоологические особенности биогеоценозов, находящихся под воздействием автомобильных дорог / Е. Г. Королёва // Проблемы почвенной зоологии. Тез. докл. 8 Всесоюз. совещ. Кн. 1. – Ашхабат, 1984. – С. 15–152.

33. Криволуцкий Д. А. Принципы экологического нормирования / Д. А. Криволуцкий, Е. А. Фёдоров // Влияние промышленных предприятий на окружающую среду. – Пущино, 1984. – С. 104–106.

34. Криволуцкий Д. А. Индикационная зоология / Д. А. Криволуцкий // Природа. – 1985. – № 7. – С. 86–91.

35. Кудяшева А. динамика численности полевки-экономки в биогеоценозах с повышенным уровнем естественной радиоактивности / А. Кудяшева, О. Шевченко, Н. Загорская // Вестн. Ин-та биологии Коми НЦ УрО РАН. – 2007. – № 2. – С. 25–30.

36. Методы оценки структуры, функционирования и разнообразия детритных пищевых сетей. Методическое руководство / под редакцией А. Д. Покаржевского, К. Б. Гонгальского, А. С. Зайцева – М.:Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН, – 2003. – С 70– 71.

37. Некрасова Л. С. Влияние медеплавильного производства на почвенную мезофауну / Л. С. Некрасова // Экология. – 1993. – № 5. – С. 83–85.

38. Новакова Э. Р. Животный мир суши как объект биоиндикации состояния окружающей среды / Э. Р. Новакова, Л. В. Кузнецова // Прикладные аспекты программы « Человек и биосфера». – М.: ВИНИТИ, 1983. – С. 27–36.

39. Оливериусова Л. Воздействие чёрной металлургии на почвенную фауну лесных и луговых природных комплексов южной тайги / Л. Оливериусова // Динамика географических систем. – М., 1983. – С. 76–79.

40. Перель Т. С. Зависимость численности и видового состава дождевых червей от породного состава лесонасаждений / Т. С. Перель // Зоологический журнал. – 1958. – Т. 36, № 2. – С. 1307 –1315.

41. Перель Т. С. Критический анализ систематики Lumbricidae (с определительной таблицей родов фауны СССР) / Т. С. Перель // Зоологический журнал. – 1977. – Т. 56, Вып. 4. – С. 493–501.

42. Перель Т. С. Различия организации разных представителей дождевых червей (Lumbricidae, Oligochaeta) в связи с особенностями их экологии / Т. С. Перель // Адаптации почвенных животных к условиям среды. – М.: Наука, 1977б. – С. 129–144.

43. Перель Т. С. Распространение и закономерности распределения дождевых червей фауны СССР. – М.: Наука, 1979. – 272 с.

44. Роднянская И. С. К вопросу о способности дождевых червей переносить высыхание / И. С. Роднянская // Учен. зап. МГПИ им. В. П. Потемкина. –1957. –С. 355–361.

45. Самойлова Т. С. Проблемы экологического нормирования нагрузки автотранспорта на экосистемы / Т. С. Самойлова // Экологические проблемы охраны живой природы. – М., 1990. – С. 166.

46. Семёнова Л. М. Морфофизиологические особенности покровов дождевых червей (Lumbricidae, Oligochaeta) в связи с их образом жизни / Л. М. Семенова // Зоологический журнал. – 1968. – Т. 47, Вып. 11. – С. 1621–1627.

47. Семёнова Л. В. Зависимость строения пищеварительной системы дождевых червей (Lumbricidae, Oligochaeta) от характера питания / Л. В. Семенова // Зоологический журнал. – 1966. – Т. 45, Вып. 7. – С. 986–997.

48. Семёнова Л. М. Морфология дождевых червей, обитающих, в разных почвенных условиях / Л. М. Семенова // Проблемы почвенной зоологии. Материалы третьего Всесоюзного совещания. – М.: Наука, 1969. – С. 148–149.

49. Семёнова Л. М. Морфофизиологические особенности покровов дождевых червей (Lumbricidae, Oligochaeta) в связи с их образом жизни/ Л. М. Семенова // Зоологический журнал. – 1968. – Т. 47, Вып. 11. – С. 1621–1627.

50. Соболев Н. А. Факторы накопления Pb и Zn дождевыми червями / Н. А. Соболев // Биоиндикация и биомониторинг. – М.: Наука, 1991. – С. 244–247.

51. Соколов А. А. Значение дождевых червей в почвообразовании. – Алма-Ата: Изд-во АН КазССР, 1956. – 262 с.

52. Сорокин И. Б. Применение биоресурса *Eisenia foetida* в земледелии подтаежной зоны Сибири / И. Б. Сорокин, Э. В. Титова, Е. А. Сиротина, Л. В. Петрова // Вермикомпостирование и вермикультивирование как основа экологического земледелия в XXI веке: достижения, проблемы, перспективы: сб. науч. тр. / ред. кол.: С. Л. Максимова [и др.]. – Минск, 2013. – С. 95–100.

53. Степанов А. М. Оценка влияния техногенных выбросов на почвенных беспозвоночных и растительный покров / А. М. Степанов, Т. В. Черненькова, Т. Н. Верещагина, Ю. О. Безукладова // Журнал общей биологии. – 1991. – Т. 52 – № 5. – С. 699–707.

54. Степанова М. Д. Подходы к оценке загрязнения почв и растений тяжёлыми металлами / М. Д. Степанова // Химические элементы в системе почва – растение. – Новосибирск: Наука. Сиб. отд-ние. – 1982. – С. 92–105.

55. Стриганова Б. Р. Методы фиксации почвенных беспозвоночных/ Б. Р. Стриганова // Методы почвенных зоологических исследований. – М.: Наука. 1975. – С. 49 – 53.

56. Терещенко Н. Н. Эффективность применения микроорганизмов, изолированных из копролитов дождевых червей, для увеличения урожайности зерновых культур / Н. Н. Терещенко, А. В. Кравец, Е. Е. Акимова,

О. М. Минаева, А.П. Зотикова // Сибирский вестник сельскохозяйственной науки. – 2013. – № 5. – С. 10–17.

57. Чекановская О. В. Дождевые черви и почвообразование / О. В. Чекановская – М.: АН СССР, 1960. – 207 с.

58. Чертов О. Г. Влияние на лесные почвы загрязнения серой в комплексе с тяжёлыми металлами / О. Г. Чертов, И. В. Лянгузова, В. Д. Друзина, Г. П. Меньшикова // Лесные экосистемы и атмосферное загрязнение. – 1990. – С. 65–72.

59. Четыркина И. А. Распределение Lumbricidae по почвам Троицкого округа Уральской области / И. А. Четыркина // Труды биологического ин-та при Пермск. гос. ун-те. – 1930. – Вып. 24, ч. 1. – С. 433–468.

60. Шеффе, Г. Дисперсионный анализ / Г. Шеффе – М.: Физматгиз, 1980. – 512 с.

61. Abdul Rida A. M. M. Heavy metal linkages with mineral, organic and living soil compartments / A. M. M. Abdul Rida, A.M. Motalib, M.B. Bouche´ // Soil Biol. Biochem. – 1997. – Vol. 29. – P. 649–655.

62. Abdul Rida A. M. M. The eradication of an earthworm genus by heavy metals in southern France / A. M. M. Abdul Rida, M. B. Bouche´// Appl. Soil Ecol. – 1995. –Vol. 2. – P. 45–52.

63. Agbaire P O. Bioaccumulation of heavy metals by earthworm (Lumbricus terrestris) and associated soils in domestic dumbsites in Abraka, Delta State, Nigeria / P. O. Agbaire, O. O. Emoyan // Int. J. Plant Anim. Environ. Sci. – 2012. – Vol. 2. – P. 210–217.

64. Agbaire P. O. Bioaccumulation of heavy metals by earthworm (Lumbricus terrestris) and associated soils in domestic dumbsites in Abraka, Delta State, Nigeria / P. O. Agbaire, O. O. Emoyan // International Journal of Plant, Animal and Environmental Sciences. – 2012. – Vol. 2. – P. 3.

65. Aja M. FT-IR spectroscopy as a sentinel technology in earthworm toxicology / M. Aja, M. Jaya, N.K. Vijayakumaran, I. Hubert Joe // Spectrochimica Acta Part A Molec. Biomolecular. Spec. – 2014. – Vol. 120. – P. 534– 541.

66. Álvarez-Otero R. Could the histology of the earthworm body wall become a useful identification character in earthworm identification? / R. Álvarez-Otero, S. Barja-Fernández, M. J. I. Briones // Book of Abstracts of the 6th International Oligochaete Taxonomy Meeting (6th IOTM). Palmeira de Faro. – Portugal, 22-25 April. Palmeira de Faro, 2013. – P. 7.

67. Arnold R. E. Development of a methodology to investigate the importance of chemical speciation on the bioavailability of contaminants to Eisenia Andrei / R. E. Arnold, C. J. Langdon, M. E. Hodson, S. Black // Pedobiologia. – 2003. – Vol. 43. – P. 633–639.

68. Atkins G. L. Multicompartment models for biological systems / G.L. Atkins – London: Methuen & Co. LTD, 1969. – 153 p.

69. Baker D. E. Chemical monitoring of soil for environmental quality animal and health / D. E. Baker, L. Chensin // Advances in agronomy. – 1975. – Vol. 27. – P. 306–366.

70. Baltzer R. Die Regenwurmer Westfalens. Eine tiergeographischs okologische und sinnesphysiologische / R. Baltzer // Untersuchung. Zool. Jahrb. –1956. – № 4. – P. 355–414.

71. Belfroid A. Modeling the accumulation of hydrophobic organic chemicals in earthworms: Application of the equilibrium partitioning theory / A. Belfroid, W. Seinen, C. A. M. Van Gestel, J. Hermens, K. Van Leeuwen // Environ Sci Pollut Res. – 1995. – Vol. 14. – P. 605–612.

72. Bengtsson G. Effects of metal pollution on the earthworm Dendrobaena rubida (Sav.) in acidified soils / G. Bengtsson, T. Gunnardsson, S. Rundgren // Water Air Soil Pollut. – 1985. – Vol. 28. – P. 361–383.

73. Bengtsson G. Population density and tissue metal concentration of lumbricids in forest soils near a brass mill / G. Bengtsson, S. Nordstrom, S. Rundgren // Environ. Pollut. – 1983. – Vol. 30. – P. 87–108.

74. Bernard F. Metallic trace element body burdens and gene expression analysis of biomarker candidates in Eisenia fetida, using an “exposure/depuration” experimental scheme with field soils / F. Bernard, F. Brulle, F. Douay, S. Lemière, S.

Demuynck, F. Vandenbulcke // Ecotoxicol. Environ. Saf. – 2010. – Vol. 73. – P. 1034–1045.

75. Berti W. R. In-place inactivation of Pb in Pb-contaminated soils / W. R. Berti, S. D. Cunningham // Environ Sci Technol. – 1997. – Vol. 31. – P. 1359–1364.

76. Beyer W. N. Relation of pH and other soil variables to concentrations of Pb, Cu, Zn, Cd, and Se in earthworms / W. N. Beyer, G. Hensler, J. Moore // Pedobiologia. – 1987. – Vol. 30. – P. 167–172.

77. Beyer W. N. A survey of Pb, Cu, Zn, Cd, Cr, As and Se in earthworms and soil from diverse sites / W. N. Beyer, E. J. Cromartie // Environ. Monit. Assess. – 1987. – Vol. 8. – P. 27–36.

78. Black A. Evaluation of soil metal bioavailability estimates using two plant species (L. perenne and T. aestivum) grown in a range of agricultural soils treated with biosolids and metal salts / A. Black, R. G. McLaren, S. M. Reichman, T. W. Speir, L.M. Condron // Environ. Pollut. – 2011. – Vol. 159. – P. 1523–1535.

79. Bonneau M. Evolution of the mineral fertility of an acidic soil during a period of ten years in the Vosges Mountains (France). Impact of humus mineralization / M. Bonneau // Ann. For. Sci. – 2005. – Vol. 62. – P. 253–260.

80. Bouche M. B.,. Lombriciens de France, Ecologie et Systematique. INRA / M. B. Bouche – Paris. 1972. – 671 p.

81. Brinza L. Can earthworm-secreted calcium carbonate immobilise Zn in contaminated soils? / L. Brinza, P. Schofield, W. Mosselmans, J. W. Frederick, E. Donner, E. Lombi, D. Paterson, M. Edward // Soil Biology & Biochemistry. – 2014. – Vol. 74. – P. 1–10.

82. Brinza L. Incorporation of strontium in earthworm-secreted calcium carbonate granules produced in strontium-amended and strontium-bearing soil / L. Brinza, P. Quinn, P. Schofield, W. Mosselmans, J. W. Frederick, M. Hodson // Geochimica et Cosmochimica Acta. – 2013. Vol. – 113. – P. 21–37.

83. Brown G. G. Regulation of soil organic matter dynamics and microbial activity in the drilosphere and the role of interactions with other edaphic functional domains /

G.G. Brown, I. Barois, P. Lavelle // European Journal of Soil Biology. – 2000. – Vol. 36. – P. 177–198.

84. Byzova J. V. The dynamics of some blood indices in earthworms (Oligochaeta, Lumbricdae) / J. V. Byzova //Rev. ecol. et boil. Sol. – 1974. – Vol. 11. – P. 325–332.

85. Cancio I. The effect of sublethal lead-exposure on the ultrastructure and on the distribution of acidphosphatase-activity in chloragocytes of earthworms (Annelida, Oligochaeta) / I. Cancio, I. Gwynn, M. P. Ireland, M. P. Cajaraville // Histochem. J. –1995. – Vol. 27. – P. 965–973.

86. Carnol M. Nutrient return to the forest floor through litter and throughfall under 7 forest species after conversion from Norway spruce / M. Carnol, M. Bazgir // Forest Ecology and Management. – 2013. – Vol. 309. – P. 66–75.

87. Ceballos A. Parental care of endogeic earthworm cocoons: is cleaning, construction, and cast surrounding of chambers related to hatching and survival of juvenile worms? / A. Ceballos, C. Fragoso // Session 5 Behavioral and Evolutionary Biology. – 2006. – P. 150.

88. Chaudhuri P. S. Earthworm casting activities under rubber (*Hevea brasiliensis*) plantations in Tripura (India) / P. S. Chaudhuri, S. Nath, T. K. Pal, S. K. Dey // World Journal of Agricultural Science. – 2009. – Vol. 5. – P. 515–521.

89. Cikutovic M. A. Sperm count in earthworms (Lumbricus terrestris) as a biomarker for environmental toxicology: effects of cadmium and chlordane / M. A. Cikutovic, L. C. Fitzpatrick, B. J. Venables, A. J. Goven // Environ. Pollut. – 1993. – Vol. 81. – P. 123–125.

90. Clause J. The interactions between soil type and earthworm species determine the properties of earthworm casts / J. Clause, S. Barot, B. Richarda, T. Decaëns, E. Forey // Applied Soil Ecology. – 2014. –Vol. 83. – P. 149–158.

91. Conder J. M. Evaluation of surrogate measures of cadmium, lead, and zinc bioavailability to Eisenia fetida / J. M. Conder // Chemosphere. – 2000. – Vol. 41. – P. 1659–1668.

92. Conder J. M. Method for determining toxicologically relevant cadmium residues in the earthworm Eisenia fetida / J. M. Conder, L. D. Seals, R. P. Lanno // Chemosphere. – 2002. – Vol. 49. – P. 1–7.

93. Cotton D. C. F. The response of earthworm populations to high applications of pig slurry / D. C. F. Cotton, J. P. Curry // Pedobiologia. –1980. – Vol. 20. – P. 189–196.

94. Crossley Jr. D. A. Turnover of cobalt-60 by earthworms (Eisenia foetida) (Lumbricidae, Oligochaeta) / D. A. Crossley Jr., E. R. Blood, P. F. Hendrix, T. R. Seastedt //Appl. Soil Ecol. – 1995. – Vol. 2. – P. 71–75.

95. Dai J. Heavy metal accumulation by two earthworm species and its relationship to total and DTPA-extractable metals in soil / J. Dai, T. Becquer, J. Henri Rouiller, G. Reversat, F. Bernhard-Reversat, J. Nahmani, P. Lavelle // Soil Biol. Biochem. – 2004. – Vol. 36. – P. 91–98.

96. Dalby P. R. «Filter paper method» to remove soil from earthworm intestines and to standardize the water content of earthworms / P. R. Dalby, G. H. Baker, S. E. Smith // Soil Biology and Biochemistry. – 1996. – Vol. 28. – P. 685-687.

97. Davies N. A. Is the OECD acute worm toxicity test environmentally relevant? The effect of mineral form on calculated lead toxicity / N. A. Davies, M. E. Hodson, S Black // Environ. Pollut. – 2003b. – Vol. 121. – P. 49–54.

98. Davies N. A. The influence of time on lead toxicity and bioaccumulation determined by the OECD earthworm toxicity test / N. A. Davies, M. E. Hodson, S. Black // Environ. Pollut. – 2003a. – Vol. 121. – P. 55–61.

99. Deleporte S. Long-term effects of mineral amendments on soil fauna and humus in an acid beech forest floor / S. Deleporte, P.Tillier // Forest Ecol. Manage. – 1999. – Vol. 118. – P. 245–252.

100. Denneman W. D. Extended water starvation: an improved method for sample preparation of lumbricidae in ecotoxicological studies / W. D. Denneman // Fresenius J. Anal. Chem. – 1994. – Vol. 348. – P. 684–687.

101. Di Toro D. M. Biotic ligand model of the acute toxicity of metals. 1. Technical basis / D. M. Di Toro, H. E. Allen, H. L. Bergman, J. S. Meyer, P. R. Paquin, R. C. Santore //Environ. Toxicol. Chem. – 2001. – Vol. 20. – P. 2383–2396.

102. Dunger W. Die Bedeutung der Bodenfauna für die Streuzersetzung/ W. Dunger // Tagunsber. Deutsch. Akad. Landwirtschaftswiss. Berlin. – 1964a. – Vol. 60. – P. 64–71.

103. Edwards C. A. Biology and Ecology of Earthworms, third ed., Chapman & Hall / C. A. Edwards, P. J. Bohlen // – London.: 1996. – 324 p.

104. Edwards P. J. Use of grassland plots to study the effect of Pesticides on earthworms / P. J. Edwards, S. M. Brown // Pedobiologia. – 1982. – Vol. 24. – P. 145–150.

105. Edwards S. C. The bioavailability of copper and mercury to the common nettle (Urtica dioica) and the earthworm Eisenia fetida from contaminated dredge spoil / S. C. Edwards, C. L. MacLeod, J. N. Lester // Water Air Soil Pollut. – 1998. – Vol. 102. – P. 75–90.

106. Fitzpatrick L. C. Comparative toxicity in earthworms Eisenia fetida and Lumbricus terrestris exposed to cadmium nitrate using artificial soil and filter paper protocols / L. C. Fitzpatrick, J. F. Muratti-Ortiz, B. J. Venables, A. J. Goven // Bull. Environ. Contam. Toxicol. – 1996. – Vol. 57. – P. 63–68.

107. Francesco N. Uptake and bioaccumulation of heavy elements by two earthworm species from a smelter contaminated area in northern Kosovo / N. Francesco, P. Giuseppe, R. Francesco // Soil Biology & Biochemistry. – 2011. – Vol. 43. – P. 2359–236.

108. Friis K. Sublethal soil copper concentrations increase mortality in the earthworm Aporrectodea caliginosa during drought / K. Friis, C. Damgaard, M. Holmstrup // Ecotoxicol. Environ. Saf. – 2004. – Vol. 57. – P. 65–73.

109. Frouz J. Soil food web changes during spontaneous succession at post mining sites: a possible ecosystem engineering effect on food web organization / J. Frouz, E. Thébault, V. Pižl, S. Adl, T. Cajthaml, P. Baldrián, P. C. de Ruiter // PLoS One. – 2013. 8

110. Gago-Duport L. Amorphous calcium carbonate in the earthworms calciferous gland: pathways to the formation of crystalline phases / L. Gago-Duport, M. J. I. Briones, J. B. Rodriguez, B. Covelo // J. Struct. Biol. – 2008. – Vol. 162. – P. 422–435.

111. Garg V. Optimization of cow dung spiked pre-consumer processing vegetable waste for vermicomposting using Eisenia fetida / V. Garg, R. Gupta // Ecotoxicol. Environ. Saf. – 2011. – Vol. 74. – P. 19–24.

112. Garvın M. H. Gametogenesis and reproduction inHormogaster elisae (Oligochaeta, Hormogastridae) / M. H. Garvın, D. Trigo, P. Hernandez, D. J. Dıaz Cosın // Inv. Biol. – 2003. – Vol.122. – P. 152–157.

113. Giovanetti A. Bioaccumulation and biological effects in the earthworm *Eisenia fetida* exposed to natural and depleted uranium / A. Giovanetti, S. Fesenko, M. L. Cozzella, L. D. Asencio, U. Sansone // Journal of Environmental Radioactivity. – 2010. – Vol. 101. – P. 509– 516.

114. Godbold D. L. Effects of Acid Rain on Forest Processes / D. L. Godbold, A. Huttermann– New York., 1994. – P. 438–455.

115. Graefe U. Critical values of soil acidification for annelid species and the decomposer community / U. Graefe, A. Beylich // Newsl. Enchytraeidae. – 2003. – Vol. 8. – P. 51–55.

116. Grelle C. Heavy metal accumulation by Eisenia fetida and its effects on glutathione-S-transferase activity / C. Grelle, M. Descamps // Pedobiologia. – 1998. – Vol. 42. – P. 289–297.

117. Hait S. Transformation and availability of nutrients and heavy metals during integrated composting-vermicomposting of sewage sludges / S. Hait, V. Tare // Ecotoxicol. Environ. Saf. – 2012. – Vol. 79. – P. 214–224.

118. Hanc A. Nutrient recovery from apple pomace waste by vermicomposting technology / A. Hanc, Z. Chadimova // Bioresource Technology. – 2014. – Vol. 168. – P. 240–244.

119. Hartenstein R. Composition of the earthworm Eisenia foetida (savigny) and assimilation of 15 elements from sludge during growth / R. Hartenstein, A. L. Leaf, E. F. Neuhauser D. H. Bickelhaupt // Comp. Biochem. Physiol. – 1980b. – Vol. 66. – P. 187–192.

120. Heikens A. Bioaccumulation of heavy metals in terrestrial invertebrates / A. Heikens, W. J. G. M. Peijnenburg, A. J. Hendriks // Environ. Pollut. – 2001. – Vol. 113. – P. 385–393.

121. Hendrix P. F. Ecological assessment of exotic earthworm invasions in North America / P. F. Hendrix, P. Bohlen // Bioscience. – 2002. – Vol. 52. – P. 801–811.

122. Hill G. B. The effectiveness and safety of vermi-versus conventional composting of human feces with ascaris suum ova as model helminthic parasites / G. B. Hill, C. Lalander, S. A. Baldwin // Journal of Sustainable Development. – 2013. – Vol. 6. – №. 4. – P. 1–10.

123. Honeycutt M. E. Cadmium disposition in the earthworms Eisenia fetida / M. E. Honeycutt, B. L. Roberts, D. S. Roane // Ecotoxicology and Environmental Safety. – 1995. – P.143–150.

124. Huhta V. Earthworm communities in birch stands with different origin in central Finland / V. Huhta // Pedobiologia. – 2004. – Vol. 48. – P. 283–291.

125. Ireland M. P. Metal content, after exposure to cadmium of two species of earthworms of known differing calcium metabolic activity / M. P. Ireland, K. S. Richards // Environ. Pollut. – 1981. – Vol. 26. – P. 69–78.

126. ISO 11268-1: 1995 Soil quality effects of pollutants on earthworms (Eisenia fetida)- Part 1: Determination of acute toxicity using artificial soil substrate. 1995, International Standards Organisation, Geneva.

127. ISO 11268-3: 1999 Soil quality effects of pollutants on earthworms, Part 3: Guidance on the determination of effects in field situations. 1999, International Standards Organisation, Geneva.

128. ISO Guideline DIS 11268-2 Soil quality effects of pollutants on earthworms (Eisenia fetida). Part 2: Determination of effects on reproduction. 1998, International Standards Organisation, Geneva.

129. Jager T. Elucidating the routes of exposure for organic chemicals in the earthworm, Eisenia andrei (Oligochaeta) / T. Jager, R. Fleuren, E. A. Hogendoorn, G. De Korte //Environ. Sci. Technol. – 2003. – Vol. 37. – P. 3399–3404.

130. Jamieson B. G. M. Oligochaeta / B. G. M. Jamieson // Soil Biology & Biochemistry. – 2002. – Vol. 7. – P. 217–322.

131. Jones C. G Organisms as ecosystem engineers / C. G. Jones, J. H. Lawton, M. Shachak // Oikos. – 1994. – Vol. 69. – P. 373–386.

132. Kang J. Influence of humic substances on bioavailability of Cu and Zn during sewage sludge composting / J. Kang, Z. Zhang, J. J. Wang // Bioresour. Technol. – 2011. –Vol. 102. – P. 8022–8026.

133. Kang J. Influence of humic substances on bioavailability of Cu and Zn during sewage sludge composting / J. Kang, Z. Zhang, J. J.Wang // Bioresour. Technol. – 2011. – Vol. 102. – P. 8022–8026.

134. Kennette D. Uptake of trace metals by the earthworm Lumbricus terrestris L. in urban contaminated soils / D. Kennette, W. Hendershot, A. Tomlin, S. Sauve // Appl. Soil Ecol. – 2002. – Vol. 19. – P. 191–198.

135. Khalil M. A. Analysis of separate and combined effects of heavy metals on the growth of Aporrectodea caliginosa (Oligochaeta; Annelida), using the toxic approach / M. A. Khalil, H. M. Abdel-Lateif, B. M. Bayoumi, N. M. van Straalen // Appl. Soil Ecol. – 1996. – Vol. 4. – P. 213–219.

136. Kuperman R. G. Relationships between soil properties and community structure of soil macroinvertebrates in oak-hickory forests along an acidic deposition gradient / R. G. Kuperman // Appl. Soil Ecol. – 1996. – Vol. 4. – P. 125–137.

137. Lambkin D. C. Soil pH governs production rate of calcium carbonate secreted by the earthworm Lumbricus terrestris / D. C. Lambkin, K. H. Gwilliam, C. Layton, M. Canti, T. G Piearce, M. E. Hodson // Ninth International Symposium on the Geochemistry of the Earth's Surface (GES-9) Appl. Geochem. – 2011. – Vol. 26, Suppl. 1. – P. 64–66.

138. Langdon C. J. Inherited resistance to arsenate toxicity in two populations of Lumbricus rubellus / C. J. Langdon, T. G. Piearce, A. A. Meharg, K. T. Semple // Environ. Toxicol. Chem. – 2003. – Vol. 22. – P. 2344–2348.

139. Langdon C. J. Pb-uptake and behaviour of three species of earthworm in Pb treated soils determined using an OECD-style toxicity test and a soil avoidance test / C. J. Langdon, M. E. Hodson, R. E. Arnold, S. Black // Environ. Pollut. – 2005. – Vol. 138. – P. 368–375.

140. Langdon C. J. Resistance to arsenic-toxicity in a population of the earthworm Lumbricus rubellus / C. J. Langdon, T. G. Piearce, S. Black, K. T. Semple // Soil Biol. Biochem. – 1999. – Vol. 31. – P. 1963–1967.

141. Lanno R. The bioavailability of chemicals in soil for earthworms / R. Lanno, J. Wells, J. Conder, K. Bradham, N. Basta // Ecotoxicology and Environmental Safety. – 2004. – Vol. 57. – P. 39–47.

142. Lavelle P. Soil Ecology / P. Lavelle, A. Spain – Kluwer Academic Publishers, The Nitherlands, 2001. – 654 p.

143. Lavelle P. Diversity of soil fauna and ecosystem function / P. Lavelle // Biology international. – 1996. – Vol. 33. – P. 3–16.

144. Lavelle P. Earthworm activities and the soil system / P. Lavelle // Biology and Fertility of Soils. – 1988. – Vol. 6. – P. 237–251.

145. Lavelle P. Faunal activities and soil processes: adaptive strategies that determine ecosystem function / P. Lavelle // Advances in Ecological Research. – 1997. – Vol. 27. – P. 93–132.

146. Lavelle P. Mutualism and biodiversity in soils / P. Lavelle, H. P. Collins, Robertson // The Significance and Regulation of Soil Biodiversity. Academic Publishers, The Netherlands. – 1995. – P. 23–33.

147. Lavelle P. Smalle-scale and large-scale effects of endogenic earthworms on soil organic matter dynamics in soils of the humid tropics / P. Lavelle, A. Martin// Soil. Biol. Biochem. – 1992. – Vol. 24. – P. 1491–1498.

148. Lavelle P. The structure of earthworm communities / P. Lavelle, In: Satchell, J.(Ed.) // Earthworm Ecology from Darwin to Vermiculture. – London., 1983. – P. 449–466.

149. Lee B. T. Arsenic accumulation and toxicity in the earthworm Eisenia fetida affected by chloride and phosphate/ B. T. Lee, K. W. Kim // Environ. Toxicol. Chem. – 2008. – Vol. 27. – P. 2488–2495.

150. Lee K. E. Earthworms: Their ecology and relationships with soil and land use / K. E. Lee – Sydney etc.: Academic Press, 1985. – 411 p.

151. Leverack M. S. The Physiology of earthworms / Leverack M. S. – London.: Pergamon Press, 1963. – 206 p.

152. Li L. Bioaccumulation of heavy metals in the earthworm (Eisenia fetida) in relation to bioavailable metal concentrations in pig manure / L. Li, Z. Xu, J. Wu, G. Tian // Bioresour. Technol. – 2010. – Vol. 101. – P. 3430–3436.

153. Lock K. Cadmium toxicity for terrestrial invertebrates:taking soil parameters affecting the bioavailability into account / K. Lock, C. R. Janssen // Ecotoxicology. – 2001b. – Vol. 10. – P. 315–322.

154. Lock K. Zinc and cadmium body burdens in terrestrial oligochaetes: use and significance in environmental risk assessment / K. Lock, C.R. Janssen //Environ. Toxicol. Chem. – 2001a. – Vol. 20. – P. 2067–2072.

155. Lofs-Holmin A. Occurrence of eleven earthworm species (Lumbricidae) in permanent pastures in relation to soil-pH / A. Lofs-Holmin // Swedish. J. agric. Res. – 1986. – Vol. 164. – P. 161–165.

156. Loureiro S. Terrestrial avoidance behavior tests as screening tool to assess soil contamination / S. Loureiro, A. M. V. M. Soares, A. J. A. Nogueira // Environ. Pollut. –2005. – Vol. 138. – P. 121–131.

157. Lourenco J. Evaluation of the sensitivity of genotoxicity and cytotoxicity end points in earthworms exposed *in situ* to uranium mining wastes / J. Lourenco, R. Pereira, A. Silva, F. Carvalho, J. Oliveira, M. Malta, A. Paiva, F. Goncalves, S. Mendo // Ecotoxicology and Environmental Safety. – 2012. – Vol. 75. – P. 46–54.

158. Lourenco L. Genotoxic endpoints in the earthworms sublethal assay to evaluate natural soils contaminated by metals and radionuclides / L. Lourenco, R. O. Perira, A. C. Silva, J. M. Morgado, F. P. Carvalho, J. M. Oliveira, M. P. Malta, A. A. Paiva, S. A. Mendo, F. J. Goncalves // J Hazard Mater. – 2011. – Vol. 186, No. 1. – P. 788–795.

159. Lowe C. N. Culture techniques for soil dwelling earthworms: a review / C. N. Lowe, K. R. Butt // Pedobiologia. – 2005. – Vol. 49. – P. 401–413.

160. Luoma S. N. Why is metal bioaccumulation so variable? Biodynamics as a unifying concept / S. N. Luoma, P. S. Rainbow // Environ. Sci. Technol. – 2005. – Vol. 39. – P. 1921–1931.

161. Ma Y. Toxicity of Pb/Zn mine tailings to the earthworm Pheretima and the effects of burrowing on metal availability / Y. Ma, N. M. Dickinson, M. H. Wong // Biol. Fertil. Soils. – 2002. – Vol. 36. – P. 79–86.

162. Ma W. Uptake of cadmium, zinc, lead, copper by earthworms near a zinc-smelting complex: influence of soil pH and organic matter / W. Ma, T. Edelman, I. van Beersum, T. Jans // Bull. Environ. Contam. Toxicol. – 1983. – Vol. 30. – P. 424–427.

163. Ma W. C. The influence of soil properties and worm-related factors on the concentration of heavy metals in earthworms / W. C. Ma // Pedobiologia. – 1982. – Vol. 24. – P. 109–119.

164. Ma W. C. Toxicity of copper to lumbricid earthworms in sandy agricultural soils amended with Cu-enriched organic waste materials / W. C. Ma // Ecol. Bull. – 1988. – Vol. 39. – P. 53–56.

165. Maboeta M. S. The effects of low lead levels on growth and reproduction of the African earthworm Eudrilus eugeniae (Oligochaeta) / M. S. Maboeta, A. J. Reinecke, S. A. Reinecke // Biol. Fertil. Soils. – 1998. – Vol. 30. – P. 113–116.

166. Maboeta M. S. Effects of low levels of lead on growth and reproduction of the Asian earthworm Perionyx excavates (Oligochaeta) / M. S. Maboeta, A. J. Reinecke, S. A. Reinecke // Ecotoxicol. Environ. Saf. – 1999. – Vol. 44. – P. 236–240.

167. Malecki M. R. The effect of metals on the growth and reproduction of Elsenia foetida (Oligochaeta, Lumbricidae) / M. R. Malecki, E. F. Neuhauser, R. C.Loehr // Pedobiologia. – 1982. – Vol. 24. 3. – P. 129–137.

168. Manh V. H. Vermicompost as an important component in substrate: effects on seedling quality and growth of muskmelon (Cucumis Melo L.) / V. H. Manh, C. H. Wang // APCBEE Procedia. – 2014. – Vol. 8. – P. 32–40.

169. Marino F. Cu - Cd interactions in earthworms maintained in laboratory microcosms: the examination of a putative copper paradox / F. Marino, S.R. Stu¨rzenbaum, P. Kille, A. J. Morgan // Comp. Biochem. Physiol – 1998b. – Vol. 120. – P. 217–223.

170. Marino F. Equilibrated body metal concentrations in laboratory exposed earthworms: can they be used to screen candidate metal adapted populations? / F. Marino, A. J. Morgan // Appl. Soil Ecol. – 1999b. – Vol. 12. – P. 179–189.

171. Marino F. The time-course of metal (Ca, Cd, Cu, Pb, Zn) accumulation from a contaminated soil by three populations of the earthworm, Lumbricus rubellus / F. Marino, A. J. Morgan // Appl. Soil Ecol. – 1999a. – Vol. 12. – P. 169–177.

172. Marinussen M. P. J.C. Cu accumulation in the earthworm Dendrobaena veneta in a heavy metal (Cu, Pb, Zn) contaminated site compared to Cu accumulation in laboratory experiments / M. P. J. C. Marinussen, S. E. A. T. M. van der Zee, F. A. M. de Haan // Environ. Pollut. – 1997a. – Vol. 96. – P. 227–233.

173. Marinussen M. P. J. C. Conceptual approach to estimating the effect of home-range size on the exposure of organisms to spatially variable soil contamination / M. P. J. C. Marinussen, S. E. A. T. M. van der Zee // Ecol. Modell. – 1996. – Vol. 87. – P. 83–89.

174. Marinussen M. P. J. C. Cu accumulation by Lumbricus rubellus as affected by total amount of Cu in soil, soil moisture and soil heterogeneity / M. P. J. C. Marinussen, S. E. A. T. M. van der Zee //Soil Biol. Biochem. – 1997. – Vol. 29. – P. 641–647.

175. Marinussen M. P. J. C. Cu accumulation by Lumbricus rubellus as affected by total amount of Cu in soil, soil moisture and soil heterogeneity / M. P. J. C.

Marinussen S. E. A. T. M. van der Zee // Soil Biol. Biochem. – 1997. – Vol. 29. – P. 641–647.

176. Markert B. A. Bioindicators & Biomonitors. Principles, Concepts and Applications / B. A. Markert, A. M. Breure, H. G. Zechmeister // Elsevier Science. – New York. 2003. – 997. p.

177. Mendoza-Hernández D. Compost and vermicompost of horticultural waste as substrates for cutting rooting and growth of rosemary / D. Mendoza-Hernández, F. Fornes, R. M. Belda // Scientia Horticulturae. – 2014. – Vol. 178. – P. 192–202.

178. Michiels N. K. Dangerous liaisons in the earthworm *Lumbricus terrestris*: The importance of precopulatory mate assessment in relation to body size / N. K. Michiels, A. Hohner, I.C. Vorndran // Behav. Ecol. – 2001. – Vol. 12. – P. 612–618.

179. Michiels N. K. Mating conflicts and sperm competition in simultaneous hermaphrodites / N. K. Michiels // Academic Press Ltd. – 1998. – P. 219–254.

180. Morgan J. E. A comparison of the cadmium-binding proteins isolated from the posterior alimentary canal of the earthworms Dendrodrilus rubidus and Lumbricus rubellus/ J. E. Morgan, C. G. Norey, A. J. Morgan, J. Kay // Comp. Biochem. Physiol. – 1989. – Vol. 92. – P. 15–21.

181. Morgan J. E. Calciumelead interactions involving earthworms. Part 2: the effect of accumulated lead on endogenous calcium in Lumbricus rubellus / J. E. Morgan, A. J. Morgan // Environ. Pollut. – 1988c. – Vol. 55. – P. 41–54.

182. Morgan J. E. Earthworms as biological monitors of cadmium, copper, lead, and zinc in metalliferous soils / J. E. Morgan, A. J. Morgan // Environ.Pollut. –1988. – Vol. 54. – P. 123–138.

183. Morgan J. E. Earthworms as biological monitors of cadmium, copper, lead and zinc in metalliferous soils / J. E. Morgan, A. J. Morgan // Environ. Pollut. – 1988b. – Vol. 54. – P. 123–138.

184. Morgan J. E. Heavy metal concentrations in the tissues, ingesta and faeces of ecophysiologically different earthworm species / J. E. Morgan, A. J. Morgan // Soil Biol. Biochem. – 1992. – Vol. 24. – P. 1691–1697.

185. Morgan J. E. Seasonal changes in the tissueemetal (Cd, Zn and Pb) concentrations in two ecophysiologically dissimilar earthworm species: pollution-monitoring implications / J. E. Morgan, A. J. Morgan // Environ. Pollut. – 1993. – Vol. 82. – P. 1–7.

186. Morgan J. E. The distribution and intracellular compartmentation of metals in the endogeic earthworm Aporrectodea caliginosa sampled from an unpolluted and a metal-contaminated site / J. E. Morgan, A. J. Morgan // Environ. Pollut. – 1998. – Vol. 99. – P. 167–175.

187. Nahmani J. Effects of heavy metal soil pollution on earthworm communities in the north of France / J. Nahmani, P. Lavelle, E. Lapied, F. van Oort // Pedobiologia. – 2004. – Vol. 47. – P. 663–669.

188. Nannoni F. Fractionation and geochemical mobility of heavy elements in soils of a mining area in northern Kosovo / F. Nannoni, G. Protano, F. Riccobono // Geoderma. – 2011a. – Vol. 161. – P. 63–73.

189. Nannoni F. Uptake and bioaccumulation of heavy elements by two earthworm species from a smelter contaminated area in northern Kosovo / F. Nannoni, G. Protano, F. Riccobono // Soil Biol. Biochem. – 2011b. – Vol. 43. – P. 2359–2367.

190. Neaman A. Effects of lime and compost on earthworm (Eisenia fetida) reproduction in copper and arsenic contaminated soils from the Puchuncaví Valley, Chile / A. Neaman, S. Huerta, S. Sauvé // Ecotoxicol. Environ. Saf. – 2012. – Vol. 80. – P. 386–392.

191. Neuhauser E. F. Bioconcentration and biokinetics of heavy metals in the earthworm / E. F. Neuhauser, Z. V. Cukic, M. R. Malecki, R. C. Loehr, P. R. Durkin // Environ. Pollut. –1995. –Vol. 89. – P. 293–301.

192. Neuhauser E. F. Dietary cobalt supplements and the growth and reproduction of the earthworm Eisenia foetida / E. F. Neuhauser, J. A. Meyer, M. R. Malecki, J. M. Thomas // Soil Biol. Biochem. –1984. – Vol. 16. – P. 521–523.

193. Neuhauser E. F. Toxicity of metals to the earthworm Eisenia fetida / E. F. Neuhauser, R. C. Loehr, D. L. Milligan, M. R. Malecki // Biol. Fertil. Soils. – 1985. – Vol. 1. – P. 149–152.

194. Ngo P. T. Transformation of buffalo manure by composting or vermicomposting to rehabilitate degraded tropical soils / P. T. Ngo, C. Rumpel, M. F. Dignac, D. Billou, T. T. Duc, P. Jouquet // Ecol. Eng. – 2011. – Vol. 37. – P. 269–276.

195. Norland M. R. Early performance of various native and introduced grasses and forbes on the Cherokee County, Kansas, Superfund site / M. R. Norland, D. L. Veith // Fifth Billings Symposium on Disturbed Land Rehabilitation. – 1990. – Vol. II. – P. 62–73.

196. Opper B. Calcium is required for coelomocyte activation in earthworms / B. Opper, P. Nemeth, P. Engelmann // Mol. Immunol. – 2010. – Vol. 47. – P. 2047–2056.

197. Owojori O. J. The combined stress effects of salinity and copper on the earthworm Eisenia fetida / O. J. Owojori, A. J. Reinecke, A. B. Rozanov // Appl Soil Ecol. – 2009. – Vol. 41. – P. 277–285.

198. Oyewumi O. Release of arsenic and other trace elements from poultry litter: Insights from a field experiment of the Delmarva Peninsula, Delaware / O. Oyewumi, M. E. Schreiber // Appl. Geochem. – 2012. – Vol. 27. – P. 1979–1990.

199. Palm J. Modelling distribution patterns of anecic, epigeic and endogeic earthworms at catchment-scale in agro-ecosystems / J. Palm, N. L. M. B. van Schaik, B. Schröder // Pedobiologia. – 2013. – Vol. 56. Is. 1. – P. 23–31.

200. Palzenberger M. The influence of a copper smelter (Brixlegg, Austria) on grassland populations of earthworms / M. Palzenberger, G. Luftenegger, P. Hannes // Environ. Geochem. Health. – 1995. – Vol. 16. – P. 551–563.

201. Pavlíček T. Opening Pandora's box II: Segmentation and evolution of hermaphroditic annelids / T. Pavlíček [et al.] // Advances in Earthworm Taxonomy VI (Annelida: Oligochaeta): Proceedings of the 6th International Oligochaete

Taxonomy Meeting (6th IOTM). Palmeira de Faro, Portugal, 22-25 April, 2013. Germany, Heidelberg: Kasparek Verlag, 2014. – P. 38–49.

202. Pavlíček T. Why are difficulties so numerous in earthworm taxonomy and in the reconstruction of their phylogeny? / T. Pavlíček, Y. Hadid // Sixth International Oligochaete Taxonomy Meeting (6th IOTM): Book of abstracts. Palmeira de Faro, Portugal, 22–25 April, 2013. – P. 45.

203. Peijnenburg W. J. G. M. Prediction of metal bioavailability in Dutch field soils for the oligochaete Echytraeus crypticus / W. J. G. M. Peijnenburg, L. Posthuma, P. G. P. C. Zweers, R. Baerselman, A. C. de Groot, R. P. M. Van Veen, T. Jager // Ecotox. Environ. – 1999. – Vol. 43. – P. 170–186.

204. Peijnenburg W. J. G. M. Relating environmental availability to bioavailability: soil type dependent metal accumulation in the oligochaete Eisenia andrei / W. J. G. M. Peijnenburg, R. Baerselman, A. C. de Groot, T. Jager, L. Posthuma, R. P. M. Van Veen // Ecotoxicol. Environ. Safety. – 1999. – Vol. 44. – P. 294–310.

205. Perlatti F. Geochemical speciation and dynamic of copper in tropical semi-arid soils exposed to metal-bearing mine wastes / F. Perlatti, X. L. Otero, F. Macias, T. O. Ferreira // Sci. Total Environ. – 2014. – Vol. 500. – P. 91–102.

206. Petersen H. A comparative-analysis of soil fauna populations and their role in decomposition processes / H. Petersen, M. Luxton // Oikos. – 1982. – Vol. 39. – P. 287–388.

207. Phillipson J. Earthworms and the factors governing their distribution in an English beechwood / J. Phillipson, R. Abel, J. Steel // Pedobiologia. – 1976. – Vol. 16. – P. 258–285.

208. Pokarzhevskii A. D. Agar as a medium for removing soil from earthworm guts / A. D. Pokarzhevskii, N. M. Van Straalen, , A. M. Semenov // Soil Biol. Biochem. – 2000. – Vol. 32. – P. 1315–1317.

209. Potthoff M. Earthworm communities in temperate beech wood forest soils affected by liming / M. Potthoff, N. Asche, B. Stein, A. Muhs, F. Beese // Eur. J. Soil Biol. – 2008. – Vol. 44. – P. 247–254.

210. Pramanik P. Changes in fungal population of fly ash and vinasse mixture during vermicomposting by (Eudrilus eugeniae) and (Eisenia fetida): documentation of cellulase isozymes in vermicompost / P. Pramanik, Y. R. Chung // Waste Manage. – 2011. – Vol. 31. – P. 1169–1175.

211. Rajapaksha N. S. S. Earthworm selection of Short Rotation Forestry leaf litter assessed through preference testing and direct observation / N. S. S. Rajapaksha, K. R. Butt, E. I. Vanguelova, A. J. Moffat // Soil Biology & Biochemistry. – 2013. – Vol. 67. – P. 12–19.

212. Reid B. J. Lead tolerance in Aporrectodea rosea earthworms from a clay pigeon shooting site / B. J. Reid, R. Watson // Soil Biol. Biochem. – 2005. – Vol. 37. –P. 609–612.

213. Reinecke A. J. Earthworms as test organisms in ecotoxicological assessment of toxicant impacts on ecosystems / A. J. Reinecke, S. A. Reinecke // In: Edwards, C.A. (Ed.), Earthworm Ecology. CRC Press. Boca Ration. 2004. – P. 299–320.

214. Reinecke S. A. Resistance of Eisenia fetida (Oligochaeta) to cadmium after long-term exposure / S. A. Reinecke, M. W. Prinsloo, A. J. Reinecke // Ecotoxicol. Environ. Saf. – 1999. – Vol. 42. – P. 75–80.

215. Sanchez E. G. Ecological preferences of some earthworm species in southwest Spain / E. G. Sanchez, B. Munoz, M. H. Garvin, J. B. Jesus, D. J. Diaz Cosin // Soil Biol. Biochem. – 1997. – Vol. 29. – P. 313–316.

216. Santore R. C. Biotic ligand model of the acute toxicity of metals. 2. Application to acute copper toxicity in freshwater fish and Daphnia / R. C. Santore, D. M. Di Toro, P. R. Paquin, H. E. Allen, J. S. Meyer // Environ.Toxicol. Chem. – 2001. – Vol. 20. – P. 2397–2402.

217. Satchell J. E. Selection of leaf litter by Lumbricus terrestris / J. E. Satchell, D. G. Lowe // Progress in soil biology. – Amsterdam, 1967. – P. 102–119.

218. Scaps P. Cadmium and lead accumulation in the earthworm Eisenia fetida (Savigny) and its impacts on cholinesterase and metabolic pathway enzyme activity / P. Scaps, C. Grelle, M. Descamps // Comp. Biochem. Physiol. – 1997. – Vol. 116. – P. 233–238.

219. Scott-Fordsmand J. J. Importance of contamination history for understanding toxicity of copper to earthworm Eisenia fetida (Oligochaeta: Annelida), using neutral-red retention assay Environ/ J. J. Scott-Fordsmand, J. M.Weeks, S. P. Hopkin // Toxicol. Chem. – 2000. – Vol. 19. – P. 1174–1780.

220. Sherman R. Potential Markets for Vermiculture and Vermicomposting Operations / R Sherman // Vermicomposting News. – 2001. – Vol. 6. – P. 99–112.

221. Shipitalo M. J. Quantifying the effects of earthworms on soil aggregation and porosity / M. J. Shipitalo, R. C. Le Bayon // In: Edwards, C.A. (Ed.), Earthworm Ecology. 2nd ed. CRC Press, Boca Raton, 2004. – P. 183–200.

222. Siekierska E. Cadmium effect on the ovarian structure in earthworm Dendrobaena veneta (Rosa) / E. Siekierska, D. Urbanska-Jasik // Environ. Pollut. – 2002. – Vol. 120. – P. 289–297.

223. Sims R.W. Earthworms. Keys and notes for the identification and study of the species / R. W. Sims, B. M. Gerard, E. J. Brill – London. 1985. – 171. p.

224. Singh J. Effect of *Eisenia fetida* on speciation of heavy metals duringvermicomposting of water hyacinth / J. Singh, A. S. Kalamdhad // Ecol. Eng. – 2013a. – Vol. 60. – P. 214–223.

225. Singh J. Reduction of bioavailability and leachability of heavy metals during vermicomposting of water hyacinth / J. Singh, A. S. Kalamdhad // Environ. Sci. Pollut. Res. – 2013b. – Vol. 20. – P. 8974–8985.

226. Singh J. Reduction of heavy metals during composting-a / J. Singh, A. S. Kalamdhad // Int. J. Environ. Prot., – 2012. – Vol. 2. – P. 36–43.

227. Smith B. A. Bioavailability of copper and zinc in mining soils / B. A. Smith, B. Greenberg, G. L. Stephenson // Arch. Environ. Contam. Toxicol. – 2012. – Vol. 62. – P. 1–12.

228. Spurgeon D. J. Earthworm responses to Cd and Cu under fluctuating environmental conditions: a comparison with results from laboratory exposures / D. J. Spurgeon, C. Svendsen, L. J. Lister, P. K. Hankard, P. Kille // Environ. Pollut. – 2005. –Vol. 136. – P. 443–452.

229. Spurgeon D. J. Effect of pH on metal speciation and resulting metal uptake and toxicity for earthworms / D. J. Spurgeon, S. Lofts, P. K. Hankard, M. Toal, D. McLellan, S. F. C. Svendsen // Environ. Toxicol. Chem. – 2006. – Vol. 25. – P. 788–796.

230. Spurgeon D. J. Extrapolation of the laboratory-based OECD earthworm toxicity test to metal-contaminated field sites / D. J. Spurgeon, S. P. Hopkin // Ecotox. – 1995. – Vol. 4. – P. 190–205.

231. Steenbergen N. T. T. M. Development of a biotic ligand model predicting acute copper toxicity to the earthworm Aporrectodea caliginosa / N. T. T. M. Steenbergen, F. Iaccino, M. de Winkel, L. Reijnders, W. J. G. M. Peijnenburg // Environ. Sci. Technol. – 2005. – Vol. 39. – P. 5694–5702.

232. Takeshi H. Earthworms and Soil pollutants / H. Takeshi, T. Kazuyoshi // Journal of Sensors. – 2011. – Vol. 11. – P. 11157–11167.

233. Tato A. Influence of size and partner preference on the female function of the earthworm Eisenia andrei (Oligochaeta, Lumbricidae) / A Tato, A. Velando, J. Domínguez // European Journal of Soil Biology. – 2006. – Vol. 42. – P. 331–333.

234. Taylor J. Comparison of litter decomposition in a natural versus coal-slurry pond reclaimed as a wetland / J. Taylor, B. Middleton // Land Degrad. Dev.–2004. – Vol. 15. – P. 439 – 446.

235. Tipping E. WHAM—A chemical equilibrium model and computer code for waters, sediments and soils incorporating a discrete site/electrostatic model of ion binding to humic substances / E. Tipping // Computational Geoscience. – 1994. – Vol. 21. – P. 973–1023.

236. Udovic M. Eisenia fetida avoidance behavior as a tool for assessing the efficiency of remediation of Pb, Zn and Cd polluted soil / M. Udovic, D. Lestan // Environ. Pollut. – 2010. – Vol. 158. – P. 2766–2772.

237. Van der Heijden G. Long-term sustainability of forest ecosystems on sandstone in the Vosges Mountains (France) facing atmospheric deposition and silvicultural change / G. van der Heijden, A. Legou, M. Nicolas, E. Ulrich, D. W. Johnson, E. Dambrine // Forest Ecol. Manage. – 2011. – Vol. 261. – P. 730–740.

238. Van Gestel C. A. M. Physico-chemical parameters determine metal bioavailability in soils / C. A. M. Van Gestel // Science of the Total Environment. – 2008. – Vol. 406. – P. 385–395

239. Van Straalen N. M. Bioavailability of contaminants estimated from uptake rates into soil invertebrates / N. M. Van Straalen, M. H. Donker, M. G. Vijver, C. A. M. van Gestel // Environ. Pollut. – 2005. – Vol. 136. – P. 409–417.

240. Van Straalen N. M. Metal concentrations in soil and invertebrates in the vicinity of a metallurgical factory near Tula (Russia) / N. M. Van Straalen, R. O. Butovsky, A.D. Pokarzhevskii, A.S. Zaitsev, S.C. Verhoef // Pedobiologia. – 2001. – Vol. 45. – P. 451–466.

241. Veltman K. Metal accumulation in the earthworm Lumbricus rubellus. Model predictions compared to field data / K. Veltman, M. A. J. Huijbregts, M. G. Vijver, W. J. G. M. Peijnenburg, P. H. F. Hobbelen, J. E. Koolhaas, C. A. M. van Gestel, P. C. J. van Vliet, A. Jan Hendriks // Environmental Pollution. – 2007. – Vol. 146. – P. 428–436.

242. Versteegh E. A. A. Environmental controls on the production of calcium carbonate by earthworms / E. A. A. Versteegh, S. Black, M. E. Hodson // Soil Biology & Biochemistry. – 2014. – Vol. 70. – P. 159–161.

243. Vig A. P. Vermicomposting of tannery sludge mixed with cattle dung into valuable manure using earthworm *Eisenia fetida* (Savigny) / A. P. Vig, J. Singh, S. H. Wani, S. S. Dhaliwal // Bioresour. Technol. – 2011. – Vol. 102. – P. 7941–7945.

244. Vijver M. G. Oral sealing using glue: a new method to distinguish between intestinal and dermal uptake of metals in earthworms / M. G. Vijver, J. P. M. Vink, C. J. H. Miermans, C. A. M. van Gestel // Soil Biol. Biochem. – 2003. – Vol. 35. – P. 125–132.

245. Wilcox C. Soil carbon and nitrogen dynamics in Lumbricus terrestris L. middens in four arable, a pasture, and a forest ecosystems / C. Wilcox, , J. Dominguez, , R. Parmelee, D. McCartney // Biol. Fertil. Soils. – 2002. – Vol. 36. – P. 26–34.

246. Wright M. A. Lead, zinc and cadmium content of earthworms from pasture in the vicinity of an industrial smelting complex / M. A. Wright, A. Stringer // Environ. Pollut. – 1980. – Vol. 23. – P. 313–321.

247. Wright M. A. Lead, zinc and cadmium content of earthworms from pasture in the vicinity of an industrial smelting complex / M. A. Wright, A. Stringer // Environ. Pollut. – 1980. – Vol. 23. – P. 313–321.

248. Xing M. Y. Changes in the chemical characteristics of water-extracted organic matter from vermicomposting of sewage sludge and cow dung / M. Y. Xing, X. W. Li, J. Yang, Z. D. Huang, Y. S. Lu // J. Hazard. Mater. – 2012. – Vol. 205. – P. 24–31.

249. Xu D. Effect of earthworm *Eisenia fetida* and wetland plants on nitrification and denitrification potentials in vertical flow constructed wetland / D. Xu, Y. Li, A. Howard , Y. Guan // Chemosphere. – 2013. – Vol. 92. Is. 2. – P. 201–206.

250. Yadav A. Recycling of organic wastes by employing Eisenia fetida / A. Yadav, V. Garg // Bioresour. Technol. – 2011a. – Vol. 102. – P. 2874–2880.

251. Zhou C. F. Subacute toxicity of copper and glyphosate and their interaction to earthworm (Eisenia fetida) / C. F. Zhou, Y. J. Wang, C. C. Li, R. J. Sun, Y. C. Yu,D.M. Zhou // Environ. Pollut. – 2013. – Vol. 180. – P. 71–77.

252. Zicsi A. Neue Angaben zur Regenwurm-Fauna der Schweiz (Oligochaeta: Lumbricidae) / A. Zicsi // Rez. suisse Zool. – 1979. – T. 86. N 2. – P. 473–484.

253. Zicsi A. Probleme der Lumbriciden-Systematik sowie die Revision zweier Gattungen (Oligochaeta) / A. Zicsi // Acta zool.– 1981. – Bd 27, N 3/4. – P. 431–442.

254. Zorn M. I. Metal redistribution by surface casting of four earthworm species in sandy and loamy clay soils / M. I. Zorn, C. A. M. Van Gestel, H. Eijsackers // Science of the Total Environment. – 2008. – Vol. 406. – P. 396–400.

Приложение А

Таблица А.1 – Характеристика пробных площадок (По Воробейчику с соавт., 1994)

Характеристика территории	**Зона токсической нагрузки**		
	Фоновая	**Буферная**	**Импактная**
Растительность	48 видов Ельники-пихтарники в травянистом ярусе преобладают крупнотравье и мелкотравье Моховойярус: *Mnium marginatum, Hepatica sp., Calliergonella cuspidata, Cratoneurum commutatum, Rhytidiadelphus calvescens, Rhytidiadelphus triquetrus, Mnium ortorhynchus, Rodobrium roseum*	39 видов Ельники-пихтарники в травянистом ярусе преобладают крупнотравье и эксплеренты Моховойярус: *Lescuraea mutabillis, Mnium marginatum*	18 видов Ельники-пихтарники в травянистом ярусе преобладают злаковые и эксплеренты Моховой ярус: *Brachytrecium populeum, Eurhium pulchellum*
Почвенный покров	Бурые горно-лесные Гумус 3.9 – 5.1% Количество генетических горизонтов 11	Бурые горно-лесные Гумус 3.8 – 4.7% Количество генетических горизонтов 8	Бурые горно-лесные Гумус 3.5 – 4.0% Количество генетических горизонтов 7
Лесная подстилка	Практически полностью состоит из разложившегося опада Толщина подстилки 1.6 – 3.3 см	Состоит наполовину из разложившегося опада Толщина подстилки 5.0 – 6.6 см	Практически полностью состоит из сохранившей структуру хвои Толщина подстилки 4.3 – 6.4 см

Продолжение таблицы А.1

Почвенный микробоценоз и почвенные ферменты	Потенциальная активность азотфиксации (азота/кг) 16.5 – 17.5 Целлюлаза 0,120 Основные виды микроскопических миксомицетов *Myrotecum verrucaria, Tricodermaviridae, Aspergillussp., Botritiscarnea*	Потенциальная активность азотфиксации (азота/кг) 1.8 – 4.5 Целлюлаза 0,081 Основные виды микроскопических миксомицетов *Myrotecum verrucaria, Aspergillussp., Botritiscarnea*	Потенциальная активность азотфиксации (азота/кг) 0.4 – 1.5 Целлюлаза 0,064 Основные виды микроскопических миксомицетов *Aspergillus sp., Botritiscarnea*
Почвенная мезофауна	Плотность (экз/м^2) 1875 – 3098 преобладают сапрофаги	Плотность (экз/м^2) 149 – 582 преобладают зоофаги	Плотность (экз/м^2) 53 – 102 преобладают зоофаги
Население беспозвоночных травостоя	Плотность (экз/м^2) 87,5 Преобладают сосущие фитофаги и зоофаги	Плотность (экз/м^2) 211,1 Преобладают сосущие фитофаги и антофилы	Плотность (экз/м^2) 298,5 Преобладают сосущие фитофаги и антофилы
Население птиц	Количество видов 90 Типичные представители: большая синица, московка, чечевица. Единично встречены глухарь и два вида неясытей.	Количество видов 86-87 Типичные представители: мухоловка-пеструшка, большая синица, московка	Количество видов 52-60 Типичные представители: мухоловка-пеструшка, большая синица, московка
Население мелких млекопитающих	Типичные представители: рыжая полевка, лесная мышь, полевая мышь, домовая мышь, крот европейский	Типичные представители: рыжая полевка, лесная мышь, полевая мышь, домовая мышь	Типичные представители: рыжая полевка, лесная мышь, полевая мышь, домовая мышь. Увеличение доли видов, проживающих в антропогенных местообитаниях

Приложение Б

Таблица Б.1 – Кислотность верхнего (0–5 см) слоя почвы (единиц pH водный) и содержание в нём подвижных форм тяжёлых металлов (мкг/г) в разных зонах загрязнения в районе действия точечного источника эмиссии поллютантов (СУМЗ) (Воробейчик Е. Л.)

Элемент	**Параметр**	**Зона загрязнения**				
		фонового (N=14, n=42)	**слабого (N=98, n=293)**	**умеренного (N=43, n=129)**	**сильного (N=30, n=89)**	**очень сильного (N=23, n=69)**
pH	X±s	5,68±0,07	5,52±0,02	5,46±0,03	5,20±0,04	4,66±0,08
	min - max	4,81–6,55	4,29–7,02	4,56–6,40	4,31–5,97	3,36–5,77
Cu	X±s	85,61±5,98	168,64±5,02	328,31±17,17	567,01±27,96	1374,53±150,37
	min - max	34,95–179,64	36,12–486,12	69,85–1095,71	101,06–1508,60	183,72–6420,70
Cd	X±s	2,15±0,22	2,79±0,08	4,45±0,24	6,68±0,40	5,08±0,40
	min - max	0,69–6,31	0,34–8,62	0,79–15,27	1,44–24,81	0,98–16,93
Pb	X±s	55,35±4,19	82,14±2,18	121,06±6,57	113,84±7,01	177,10±22,76
	min - max	26,35–128,82	18,18–240,65	15,93–431,88	12,23–379,78	13,80–849,86
Zn	X±s	121,50±11,64	146,54±4,89	213,16±12,66	286,54±17,97	231,06±16,65
	min - max	31,81–313,44	10,24–582,92	25,82–832,84	51,97–948,17	65,93–752,19

Примечание. N – количество пробных площадей в пределах зоны, n – количество образцов; X±s – среднее арифметическое ± ошибка среднего (учётная единица – образец); min–max – минимальное и максимальное значения в пределах зоны (учётная единица – образец).