

ИССЛЕДОВАНИЕ ОТВЕТНЫХ РЕАКЦИЙ ЧЕРВЕЙ *Eisenia fetida* ПРИ ВНЕСЕНИИ В СРЕДУ ОБИТАНИЯ НАНОЧАСТИЦ МЕДИ И ЦИНКА

Vershinina I.A., Lebedev S.V.

INVESTIGATION OF THE RESPONSES OF THE *Eisenia fetida* WORMS WHEN COPPER AND ZINC NANOPARTICLES ARE INTRODUCED INTO THE HABITAT

Аннотация. Исследования проведены на модели червей *Eisenia fetida*, которых культивировали на искусственной почве, куда вносили НЧ Zn и Cu в дозах 0; 100; 250; 500 и 1000 мг/кг сухой почвы. Выживаемость червей при экспозиции на искусственном (контрольном) субстрате в контроле составила 100%. При этом снижение выживаемости на 20% ($p \leq 0,05$) было зафиксировано при внесении НЧ Zn в дозе 500 мг/кг сухой почвы на 14 сутки. Выживаемость при внесении средних доз НЧ Cu находилась в пределах 90-100%, снижение выживаемости до 20% была характерна для концентрации 500 мг/кг на 14 сутки. В ходе исследований был установлен дозозависимый характер накопления меди и цинка *Eisenia fetida*. При дозе НЧ Zn 1000 мг/кг наблюдалось выведение цинка из организма червей со скоростью 3,9 мг/кг/сут и уменьшалась с увеличением дозы вносимых НЧ Zn. Выведение меди из организма червей наступало при концентрации 500 мг/кг НЧ Cu на 14 сутки. При этом скорость выведения из тела червя увеличивалась при повышении концентрации металла в почве (на 34-53% ($p \leq 0,05$)). Максимум биоаккумуляции был зафиксирован при внесении 100 мг/кг НЧ Cu. Таким образом, на искусственной почве накопление меди и цинка было дозозависимым параметром. Организм червя способен аккумулировать цинк при внесении НЧ до значения 500 мг/кг включительно, с последующим выведением во внешнюю среду при концентрации 1000 мг/кг почвы. При концентрации 500 мг/кг НЧ Cu на искусственной почве было отмечено выведение металла из тела червя на 14 сутки. Максимум биоаккумуляции НЧ Cu был зафиксирован при внесении 100 мг/кг НЧ Cu.

Ключевые слова: наночастицы, медь, цинк, *Eisenia fetida*, антиоксидантные ферменты, концентрация металлов

Сведения об авторах: Вершинина Ирина Александровна, SPIN-код: 8233-1886, Федеральный научный центр биологических систем и агротехнологий Российской академии наук, г.

Abstract. In our study, we chose *Eisenia fetida* worms as the object of study, which were cultivated on artificial soil, where Zn and Cu NPs were added at doses of 0; 100; 250; 500 and 1000 mg/kg dry soil. The survival rate of worms when exposed to an artificial substrate in the control was 100%. 20% decrease in survival was recorded when Zn NPs were introduced at a dose of 500 mg/kg of dry soil on the 14th day. The survival rate with the introduction of Cu NP was 90-100%, at the same time the lowest survival rate (20%) was noted at a concentration of 500 mg/kg on day 14. In the course of studies, the dose-dependent nature of the accumulation of copper and zinc in *Eisenia fetida* was established. At a dose of 1000 mg/kg Zn NPs, zinc was excreted from the body of worms at a rate of 3.9 mg/kg/day and decreased with an increase in the dose of introduced Zn NPs. Excretion of copper from the body of worms occurred at a concentration of 500 mg/kg of Cu NP on day 14. At the same time, the rate of elimination from the body of the worm increased with an increase in the concentration of metal in the soil (by 34-53%). The maximum bioaccumulation was recorded with the addition of 100 mg/kg of Cu NP. Thus, on artificial soil, the accumulation of copper and zinc was a dose-dependent parameter. The worm's body is capable of accumulating zinc when NPs are added up to 500 mg / kg, inclusive, with subsequent excretion into the external environment at a concentration of 1000 mg / kg of soil. At a concentration of 500 mg/kg of Cu NPs on artificial soil, the removal of metal from the body of the worm on the 14th day was noted. The maximum bioaccumulation of Cu NPs was recorded upon the addition of 100 mg/kg Cu NP.

Keywords: nanoparticles, copper, zinc, *Eisenia fetida*, antioxidant enzymes, metal concentration.

About the authors: Vershinina Irina Alexandrovna, SPIN code: 8233-1886, Federal Research Centre of Biological Systems and Agrotechnologies of the Russian Academy of Sciences, Orenburg, Russia, gavrish.irina.ogu@gmail.com; Lebedev Svyatoslav

Оренбург, Россия, gavrish.irina.ogu@gmail.com; Лебедев Святослав Валерьевич, ORCID: 0000-0001-9485-7010, Scopus ID: 56982531600, SPIN-код: 9750-9900, д-р биол. наук, Федеральный научный центр биологических систем и агротехнологий Российской академии наук, г. Оренбург, Россия, lsv74@list.ru

Valerievich, ORCID: 0000-0001-9485-7010, Scopus ID: 56982531600, SPIN-code: 9750-9900, Dr. habil., Federal Research Center for Biological Systems and Agrotechnologies of the Russian Academy of Sciences, Orenburg, Russia, lsv74@list.ru

Вершинина И.А., Лебедев С.В. Исследование ответных реакций червей *Eisenia fetida* при внесении в среду обитания наночастиц меди и цинка // Вестник Нижневартковского государственного университета. 2022. № 1(57). С. 45–54. <https://doi.org/10.36906/2311-4444/22-1/05>

Vershinina, I.A. & Lebedev, S.V. (2022). Investigation of the Responses of the *Eisenia fetida* Worms when Copper and Zinc Nanoparticles are Introduced into the Habitat. *Bulletin of Nizhnevartovsk State University*, (1(57)), 45–54. (in Russ.). <https://doi.org/10.36906/2311-4444/22-1/05>

Введение. Сегодня возрастающие объемы производства и использования наночастиц создает риски их поступления в окружающую среду [9].

При этом перспективной моделью для исследования ответных реакций организмов в почве в качестве тест-объекта является земляная червь *Eisenia fetida*, который активно используется для экотоксикологической оценки вновь создаваемых веществ и препаратов [2]. *Eisenia fetida* обладает высокой информативностью, что обусловлено биологическими особенностями *E. fetida*, а именно высокой проницаемостью поверхности тела для поллютантов и поглощением питательных веществ кожным маршрутом. Кроме того, высок потенциал применения червей при биоремедиации загрязненных земель, так как они способствуют уменьшению почвенных агрегатов, что имеет потенциал для высвобождения связанных с почвой загрязнителей. Такая деятельность увеличивает площадь поверхности органического вещества почвы, что влияет на долю материала, подверженного микробному взаимодействию, что также применяется в биоремедиационных технологиях [15]. К сожалению, имеется мало информации о влиянии различных концентраций наночастиц в почве на беспозвоночных, и остается неясным, до какой степени способны аккумулировать металлы эти организмы [11]. В научных публикациях недостаточно данных о влиянии металлических наночастиц (в частности, меди и цинка) на индикаторные показатели почвенных организмов, что является объективной причиной для проведения настоящего исследования. *Целью работы* стало исследование ответных реакций червей *Eisenia fetida* в ответ на внесение в среду обитания наночастиц меди и цинка.

Материалы и методы. *Объектами исследования* стали лабораторные культуры червей *Eisenia fetida* были получены от ООО «БиОЭра-Пенза» (г. Пенза, Россия). Червей помещали в пластиковые контейнеры (0.4×0.15×0.02 м) с приготовленным субстратом по 10 штук. Эксперимент проводился при t воздуха $22\pm 2^\circ\text{C}$, и t субстрата $25\pm 2^\circ\text{C}$, в 5 повторностях. Испытания действия НЧ на червях проводились по OECD guidelines for the testing of chemicals (ОЭСД, 1984; 2010).

В качестве *материала исследования* использовались наночастицы меди ($d=50-110$ нм, Плазмотерм», Россия) и цинка ($d=90-150$ нм, «Передовые порошковые технологии», Россия). Выбор наночастиц для исследования был обусловлен их крупнотоннажным промышленным производством, и распространенностью в земной коре [18; 19].

В исследовании использована искусственная почва, состоящая из 70% кварцевого песка (сухой вес), 20% каолина и 10% измельченного торфа, согласно общепринятым стандартам (OECD 1984). Для поддержания требуемой дисперсности суспензий НЧ образцы интенсивно пипетировали

и обрабатывали в ультразвуковой ванне («Сапфир ТТЦ», Россия) в течение 30 мин. Приготовленные лиозоли НЧ были смешаны с влажной искусственной почвой (влажность 45-50%), затем доведены дистиллированной водой до влажности 75-80% и перемешаны с помощью миксера.

Биохимические показатели червей. Содержание белка в теле червей оценивали с помощью коммерческих наборов «ДиаконВет» (Россия) на автоматическом биохимическом анализаторе CS-T240 («DIRUI Industrial Co., Ltd», Китай). Для этого готовились вытяжки из червей путем их гомогенизации в буфере (Tris 50 ммоль/л, DTT 1,0 ммоль/л, EDTA 1,0 ммоль/л, сахараза 250 ммоль/л, pH 7,5), который добавляли в соотношении 1:9 [1]. Черви были гомогенизированы на гомогенизаторе тканей TissueLyser LT, QIAGEN («QIAGEN», Германия).

Активность системы антиоксидантной защиты. Измерение активности супероксиддисмутазы (СОД) осуществляли по аутоокислению эпинефрина (адреналина) при $\lambda=480$ нм [14], а каталазы (КАТ) по методу [4], основанным на взаимодействии H_2O_2 с йодистым калием. Степень перекисного окисления липидов (ПОЛ) оценивали по малоновому диальдегиду (МДА) по общепринятому методу [8].

Концентрацию металлов в E.fetida определяли в начале и конце эксперимента на масс-спектрометре Agilent ICP-MS 7500 («Agilent Technologies», USA).

Биоаккумуляцию металла рассчитывали по формуле $BSAF = \text{Содержание металла в черве} / \text{общее содержание металла в почве}$ [7].

Поглощение металла определяли по формуле $R = (M_a - M_b) / M_e \times 100\%$, где M – масса, мг, a – в конце эксперимента, b – в начале, e – масса червя.

Скорость накопления металла в течение периода экспозиции оценивалась с помощью следующего уравнения: $S = \Delta C_{\text{червь}} / \Delta T = (C_{\text{червь}2} - C_{\text{червь}1}) / (t_{n2} - t_{n1})$, [21], где $C_{\text{червь}}$ – концентрация вещества в черве в день выборки, t_n – дни выборки.

При определении достоверности различий между анализируемыми выборками вычисляли средние арифметические значения и их стандартные ошибки. Достоверными считали различия при вероятности ошибки $P \leq 0,05$.

Обсуждение результатов. Влияние НЧ Zn на индикаторные показатели *Eisenia fetida* на искусственной субстрате. Выживаемость червей при экспозиции в контроле составила 100%. При этом мы наблюдали снижение выживаемости на 20%, превышающее предел валидности теста, что было характерно для НЧ Zn в дозе 500 мг/кг сухой почвы на 14 сутки. Смертность является общепринятым, но довольно нечувствительным параметром оценки токсичности вещества; поэтому были оценены другие сублетальные эффекты: изменения в массе, содержании белка, активности антиоксидантных ферментов и степень поглощения металла на 7 и 14 сутки экспозиции (рис. 1А). Зафиксировано, что дозозависимый эффект проявлялся в снижении массы червей, с наибольшим эффектом при концентрации НЧ Zn 250 мг/кг почвы на 14 день эксперимента, на фоне снижения белка на 19,5-46,3% ($p \leq 0,05$) при концентрации НЧ Zn 500-1000 мг/кг сухой почвы (рис. 1Б).

Активность ферментов антиоксидантной защиты червей была преимущественно выше контроля, что свидетельствуют о возрастании экологического стресса и образования активных радикалов кислорода в организме (рис. 2). При этом наибольшее влияние на активность ферментов антиоксидантной защиты оказывали концентрации НЧ Zn 250-500 мг/кг сухой почвы. Также во всем диапазоне концентраций наночастиц содержание МДА было выше контроля. Степень накопления металла в организме червя *E. fetida* сопровождалось накоплением Zn в теле *E. fetida* на 16,26%

($p \leq 0,05$) при дозе 50 мг/кг; 63,5% ($p \leq 0,05$) – 1000 мг/кг (рис. 3). При увеличении сроков экспозиции динамика кумуляции микроэлементов сохранялась только для величин НЧ до 500 мг/кг. Тогда как при максимальной дозовой нагрузке 1000 мг/кг уровень Zn в теле *E.fetida* к 14 сутками снизился на 52,5% ($p \leq 0,05$) по сравнению с семисуточной экспозицией.

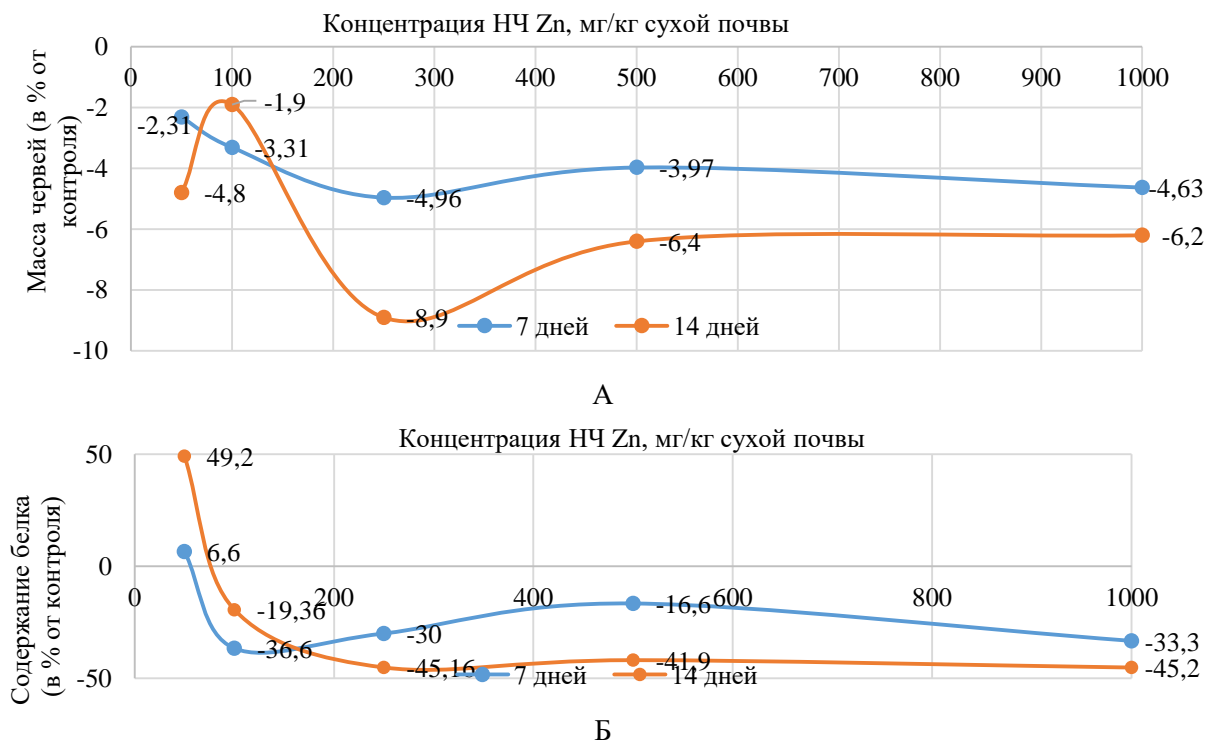


Рис. 1. Масса *E. fetida* (А) и содержание белка в *E. fetida* (Б) при внесении НЧ Zn в искусственную почву

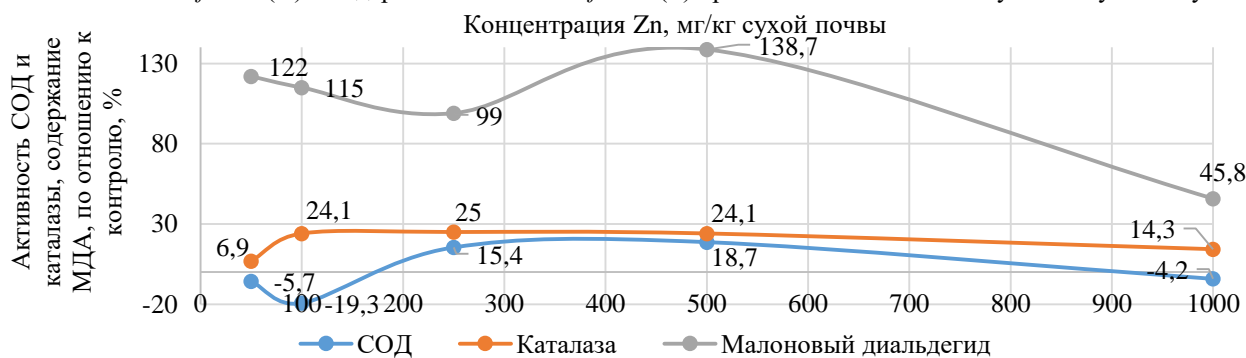


Рис. 2. Активность антиоксидантных ферментов и содержание МДА в теле *E. fetida* при внесении НЧ Zn в искусственную почву

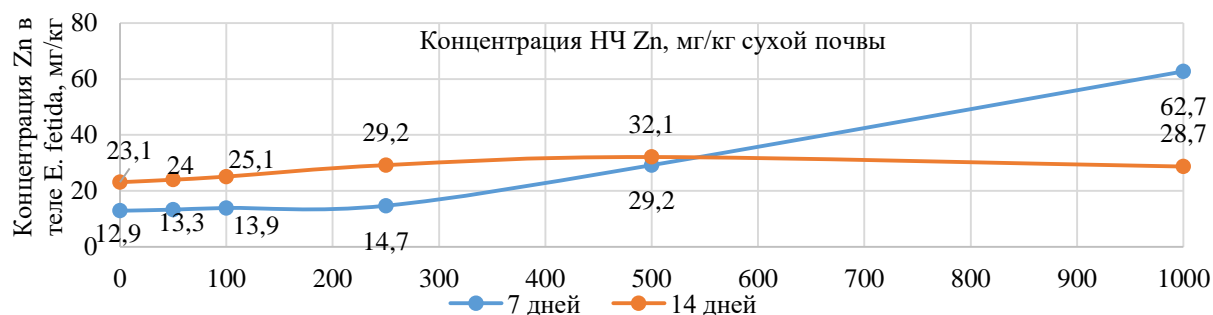


Рис. 3. Содержание Zn в теле *E. fetida* при инкубации на искусственной почве

Дозовый эффект проявлялся в увеличении скорости накопления и поглощения Zn при дозе 50 мг/кг на 17,14 % ($p \leq 0,05$) и 7,2% ($p \leq 0,05$), при 200 мг/кг на 36,9% ($p \leq 0,05$) и 29,4% ($p \leq 0,05$), при 500 мг/кг 49,1% ($p \leq 0,05$) и 51,3% ($p \leq 0,05$) и при 1000 мг/кг на 40,8% ($p \leq 0,05$) и 46,1% ($p \leq 0,05$), на 7 и 14 сутки, соответственно. При дозе 1000 мг/кг скорость накопления составила за 7 суток 13,7 мг/кг/сут, а в последующем периоде (7-14 суток) характеризовался выведением металла со скоростью 3,9 мг/кг/сут. Таким образом, организм червя способен аккумулировать цинк до значения 500 мг/кг, с последующим выведением во внешнюю среду при концентрации 1000 мг/кг почвы.

Влияние НЧ Си на индикаторные показатели *Eisenia fetida* на искусственном субстрате. Выживаемость червей при внесении НЧ Си находилась в пределах 90-100% на протяжении всего эксперимента, за исключением варианта с дозой воздействия 500 мг/кг, где исследуемый показатель составил 80% и 20%, на 7 и 14 сутки соответственно. На этом фоне масса червей снижалась на протяжении 14 суток во всех исследованных концентрациях. Так, на 7 сутки масса червей была ниже контроля на 6,5-20,1% ($p \leq 0,05$), а на 14 сутки – на 21,0-45,6% ($p \leq 0,05$), при этом при концентрации 500 мг/кг НЧ Си масса червей была наименьшей (рис. 4А).

Количество белка в тканях *E. fetida* на 14 сутки снижалось от 30,5 до 41,6% ($p \leq 0,05$) при воздействии концентраций 250-1000 мг/кг НЧ Си (рис. 4Б).

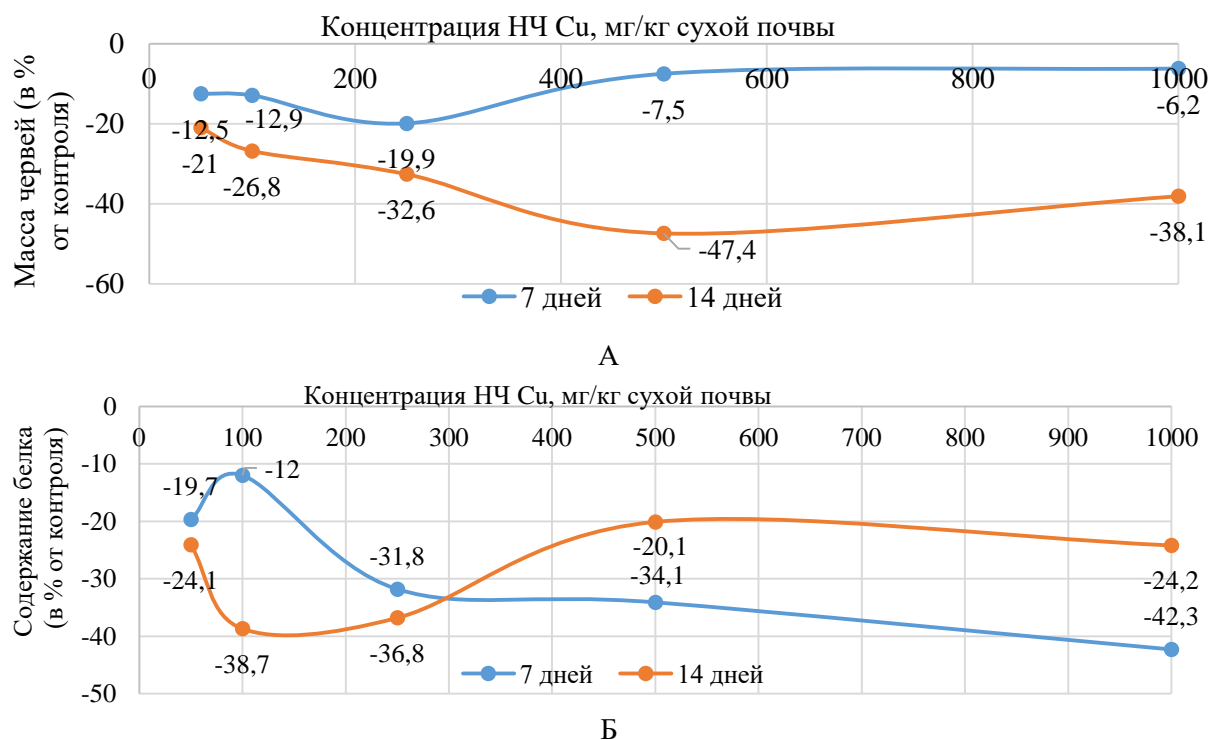


Рис. 4. Масса *E. fetida* (А) и содержание белка в *E. fetida* (Б) при внесении НЧ Си в искусственную почву

Активность ферментов антиоксидантной защиты имела разнополярные значения, так активность каталазы была на 44,7-101% ($p \leq 0,05$) выше контроля, а активность, СОД, наоборот, на 58,3-69,5% ($p \leq 0,05$) ниже контроля. Уровень МДА на 16,6-33,3% ($p \leq 0,05$) было выше контрольных значений, кроме концентрации 1000 мг/кг (рис. 5).

Если первоначальное содержание Си в черве составило 6,25 мг/кг, то на 7 сутки, в присутствии НЧ Си концентрация в черве увеличилась при дозе Си 50 мг/кг на 65% ($p \leq 0,05$) (рис. 6) (поглощение – 0,27 мг/%), при дозе 100 мг/кг на 67% ($p \leq 0,05$) (поглощение – 0,28 мг/%), при дозе

500 мг/кг на 78% ($p \leq 0,05$) (поглощения – 0,48 мг/%). На 14 сутки наибольшая аккумуляция металла в черве зафиксирована в червях при концентрации НЧ Cu 100 и 500 мг/кг, что составило 91,9% ($p \leq 0,05$) и 89,2% ($p \leq 0,05$), при степени поглощения металла соответственно 1,3 и 0,8 мг/%.

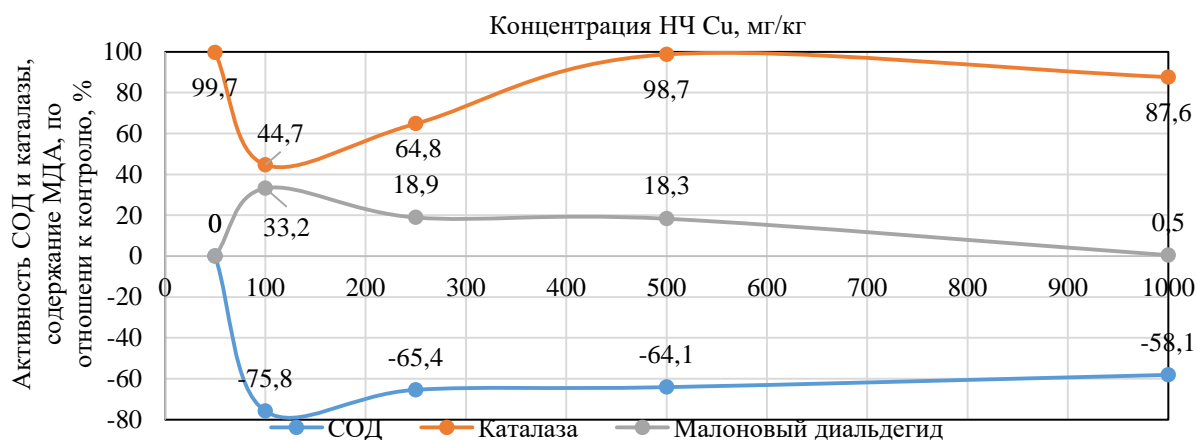


Рис. 5. Активность антиоксидантных ферментов и содержание МДА в теле *E. fetida* при внесении НЧ Cu в искусственную почву

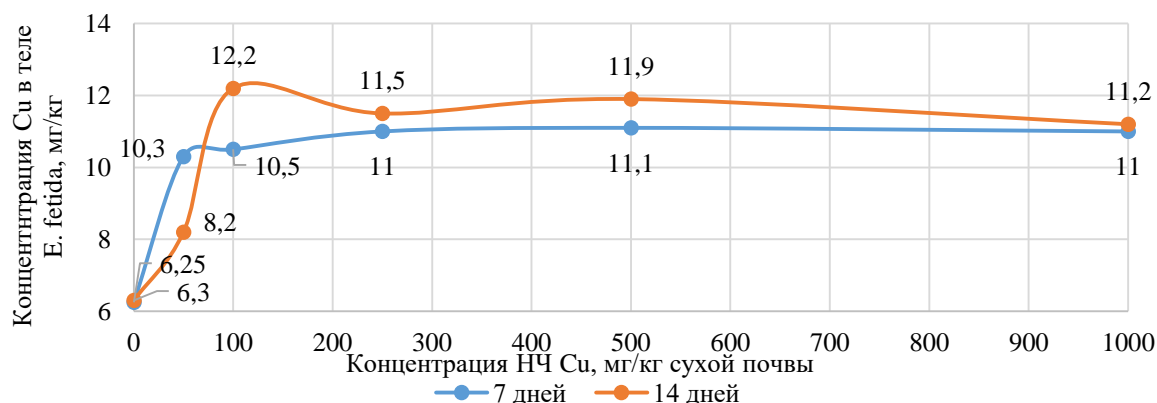


Рис. 6. Содержание Cu в теле *E. fetida* при инкубации в искусственной почве

При этом минимальная пороговая концентрация регуляции для Cu составила 35 мг/кг, что свидетельствует о способности червя контролировать обмен меди, и опосредованно может снижать токсическую нагрузку на почвенный биоценоз при определенной степени загрязнения. Сравнивая период 7 и 14 суток, концентрация меди в почве при добавлении НЧ Cu в концентрации 100-500 мг/кг почвы снизилась от 34 до 53% ($p \leq 0,05$).

Различная степень аккумуляции меди в организме червя оказала влияние на активность антиоксидантных ферментов, в зависимости от концентрации наночастиц Cu и сроков экспозиции.

Обсуждение. При воздействии высоких концентраций НЧ Zn наблюдалось достоверное снижение массы тела, что согласуется с исследованиями [10]. Подтверждают и результаты Spurgeon с соавторами [16], где червям, живущим в металл-загрязненных почвах, нужно больше времени, чтобы достичь максимальной массы, чем в незагрязненных участках.

Дождевые черви способны снижать токсическую нагрузку на организм путем перераспределения металла из почвы в органы и ткани [20]. Биодоступность и биоаккумуляция зависит от размерности, концентрации, типа почвы и продолжительности времени экспозиции [13].

Различное поглощение Zn на 7 сутки, т.е. снижение его концентрации в черве связано как, с адаптацией к субстрату, так и со способностью *E. fetida* регулировать содержание Zn в теле.

Живые организмы, в частности дождевые черви способны связывать цинк в тканях, путем участия металлотионов в этом процессе, способствуя быстрому выведению Zn и могут регулировать содержание в теле Zn до концентрации в почве до 560 мг/кг, выше этой концентрации происходит значительное накопление металла [3]. Этими выводами объясняется многие полученные нами результаты, в частности высокая смертность при концентрации 500 мг/кг, связанная с индукцией окислительного стресса в клетках.

Фермент СОД участвует в удалении активных форм кислорода и любые изменения в экологическом фоне отражают изменения окислительного стресса. Аналогичные зависимости биологической активности наночастиц описана в работе [12], где активность SOD в дождевых червей увеличивается с умеренной экологического стресса и уменьшается с тяжелой экологической напряженностью.

Активность САТ у *Eisenia fetida* возрастала при достижении концентрации наночастиц в искусственной почве Zn 500 мг/кг и снизилась при дозе 1000 мг/кг. Это связано с напряжением адаптации на критическое содержание металла в биосубстрате и высокой степенью оборота металла между субстратом и пищеварительной системой червя [6].

Каталаза (САТ) является важным ферментом в системе антиоксидантной защиты. Его способность исключать свободный радикал защищает клетки от повреждений, и его изменение рассматривается как предвестник загрязнения окружающей среды [5].

Итак, установлено, что черви способны переносить окислительный стресс и активировать антиоксидантную систему на первой стадии стресса при высоких концентрациях наночастиц. Наибольший токсический эффект был получен при дозе НЧ Zn 250-500 мг/кг, обоснованный поведенческими реакциями, ростовыми характеристиками и показателями ферментативной активности в организме червя. На основании полученных данных искусственная почва может использоваться в качестве тестового субстрата.

При внесении НЧ Cu было показано, что активность каталазы повышалась, что может косвенно свидетельствовать о том, что после длительного воздействия высоких концентраций наночастиц превышает пропускную способность поглощать активные формы кислорода, то есть защитные свойства антиоксидантных ферментов могут быть утеряны при увеличении токсического стресса в присутствии наночастиц меди. Активность СОД в черве снижалась при всех концентрациях НЧ Cu. По мнению исследователей [17], активность СОД в тканях червей увеличивается с умеренным экологическим стрессом и уменьшается при увеличении стрессовой нагрузки. Таким образом, можно обсуждать, что НЧ Cu обладают пролонгированным действием, и процесс релаксации системы к нормальному состоянию может занять определенное время после исключения токсиканта.

При этом, в отличии от варианта опыта с внесением НЧ Zn, черви накапливали медь во всех концентрациях без существенных отличий. Так, на 14 день эксперимента черви обнаруживали в своих тканях меди 11,2-12,08 мг/кг, за исключением дозы НЧ 50 мг/кг (где содержание меди

составило 8,2 мг/кг тканей червя). При этом 7 и 14 сутки не обнаруживали существенных различий в накоплении меди, что может косвенно говорить о регулировании содержания меди в теле черви на пороговом уровне.

Заключение. При культивировании НЧ Zn и НЧ Cu с *E.fetida* на искусственной почве наибольший отрицательный эффект имели дозировки 250-500 мг/кг почвы.

На искусственной почве накопление меди и цинка было дозозависимым параметром. В целом, черви были способны к биоаккумуляции высоких доз металлов в почве до уровня по цинку до 33,6 мг/кг, по меди – 12,08 мг/кг.

Биоаккумуляция цинка была снижена при увеличении дозы вносимых НЧ Zn. Таким образом, организм червя способен аккумулировать цинк при внесении НЧ до значения 500 мг/кг включительно, с последующим выведением во внешнюю среду при концентрации 1000 мг/кг почвы, что может быть использовано при биоремедиации антропогенно загрязненных земель.

При 500 мг/кг НЧ Cu на искусственной почве было отмечено выведение металла из тела червя на 14 сутки. При этом увеличение скорости выведения из тела червя наблюдали при повышении концентрации металла в почве (на 34-53%). Максимум биоаккумуляции был зафиксирован при внесении 100 мг/кг НЧ Cu.

Полученные данные о пределах толерантности червей при нагрузке почвы наночастицами меди и цинка могут быть использованы при разработке методов и подходов к восстановлению почвы, загрязненных тяжелыми металлами в различной их форме.

ЛИТЕРАТУРА

1. Дерябин Д.Г., Алешина Е.С., Дерябина Т.Д., Ефремова Л.В. Биологическая активность ионов, нано- и микрочастиц Cu и Fe в тесте ингибирования бактериальной биолюминесценции // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2011. Т. 9. №6. С. 31-36.
2. Alves P., Bandeira F. O., Giraldo M., Presotto R., Segat J.C., Cardoso E., Baretta D. Ecotoxicological assessment of Fluazuron: effects on *Folsomia candida* and *Eisenia Andrei* // Environmental Science and Pollution Research, 2019. Vol. 26. №6. P. 5842-5850. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-4022-7>
3. Bauer-Hilty A., Dallinger R., Berger B. Isolation and partial characterization of a cadmium-binding protein from *Lumbricus variegatus* (*Oligochaeta*, *Annelida*) // Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology. 1989. Vol. 94. №2. P. 373-379. [https://doi.org/10.1016/0742-8413\(89\)90085-6](https://doi.org/10.1016/0742-8413(89)90085-6)
4. Böhmer A., Jordan J., Tsikas D. High-performance liquid chromatography ultraviolet assay for human erythrocytic catalase activity by measuring glutathione as o-phthalaldehyde derivative // Analytical Biochemistry. 2011. №410. P. 296-303. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2010.11.026>
5. Brown P. J., Long S. M., Spurgeon D. J., Svendsen C., Hankard P. K. Toxicological and biochemical responses of the earthworm *Lumbricus rubellus* to pyrene, a non-carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbon // Chemosphere. 2004. №57. P. 1675-1681. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2004.05.041>
6. Chelikani P., Fita I., Loewen P. C. Diversity of structures and properties among catalases // Cellular and Molecular Life Sciences. 2004. Vol. 61. №. 2. P. 192-208. <https://doi.org/10.1007/s00018-003-3206-5>
7. Cortet J., Gomot-De Vaufleury A., Poinot-Balaguer N., Gomot L., Texier C., Cluzeau D. The use of invertebrate soil fauna in monitoring pollutant effects // European Journal of Soil Biology. 1999. Vol. 35. №3. P. 115-134. [https://doi.org/10.1016/S1164-5563\(00\)00116-3](https://doi.org/10.1016/S1164-5563(00)00116-3)
8. Heath R. L., Parker L. Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation // Archives of Biochemistry and Biophysics. 1968. Vol. 125. №2. P. 189-198. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(68\)90654-1](https://doi.org/10.1016/0003-9861(68)90654-1)
9. Khan S., Sengül H. Experimental investigation of stability and transport of TiO₂ nanoparticles in real soil columns // Desalination and Water Treatment, 2016. Vol. 57. №54. P. 26196-26203. <https://doi.org/10.1080/19443994.2016.1163513>
10. Kool P. L., Ortiz M. D., Van Gestel C. A. M. Chronic toxicity of ZnO nanoparticles, non-nano ZnO and ZnCl₂ to *Folsomia candida* (*Collembola*) in relation to bioavailability in soil // Environmental Pollution. 2011. Vol. 159. №10. P. 2713-2719. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2011.05.021>

11. Lebedev S., Yausheva E., Galaktionova L., Sizova E. Impact of molybdenum nanoparticles on survival, activity of enzymes, and chemical elements in *Eisenia fetida* using test on artificial substrata // *Environmental Science and Pollution Research*. 2016. Vol. 23. №18. P. 18099-18110. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-6916-6>
12. Liu T., Zhu L., Han Y., Wang J., Wang J., Zhao Y. The cytotoxic and genotoxic effects of metalaxyl-M on earthworms (*Eisenia fetida*) // *Environmental toxicology and chemistry*. 2014. Vol. 33. №10. P. 2344-2350. <https://doi.org/10.1002/etc.2682>
13. Peakall D., Burger J. Methodologies for assessing exposure to metals: speciation, bioavailability of metals, and ecological host factors // *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2003. Vol. 56. №1. P. 110-121. [https://doi.org/10.1016/S0147-6513\(03\)00055-1](https://doi.org/10.1016/S0147-6513(03)00055-1)
14. Ravi Kiran, T., Aruna, H. K. Antioxidant enzyme activities and markers of oxidative stress in the life cycle of earthworm, *Eudrilus eugeniae* // *Italian Journal of Zoology*. 2010. Vol. 77. №2. P. 144-148. <https://doi.org/10.1080/11250000902932841>
15. Sanchez-Hernandez J., Ro K., Díaz F. Biochar and earthworms working in tandem: Research opportunities for soil bioremediation // *Science of the total environment*. 2019. Vol. 688. P. 574-583. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.06.212>
16. Spurgeon D. J., Hopkin S. P., Jones D. T. Effects of cadmium, copper, lead and zinc on growth, reproduction and survival of the earthworm *Eisenia fetida* (Savigny): assessing the environmental impact of point-source metal contamination in terrestrial ecosystems // *Environmental Pollution*. 1994. Vol. 84. №2. P. 123-130. [https://doi.org/10.1016/0269-7491\(94\)90094-9](https://doi.org/10.1016/0269-7491(94)90094-9)
17. Sun W., Tai T. Y., Lin Y. S. Effect of monosultap on protein content. SOD and AChE activity of *Eisenia foetida* under two different temperatures // *Journal of Agro-Environmental Science*. 2007. №. 26. P. 1816-1821.
18. Świątek Z. M., Van Gestel C. A. M., Bednarska A. J. Toxicokinetics of zinc-oxide nanoparticles and zinc ions in the earthworm *Eisenia Andrei* // *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2017. Vol. 143. P. 151-158. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.05.027>
19. Tatsi K., Shaw B.J., Hutchinson T.H., Handy R.D. Copper accumulation and toxicity in earthworms exposed to CuO nanomaterials: Effects of particle coating and soil ageing // *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2018. Vol. 166. P. 462-473. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.09.054>
20. Udovic M., Lestan D. Redistribution of residual Pb, Zn, and Cd in soil remediated with EDTA leaching and exposed to earthworms (*Eisenia fetida*) // *Environmental technology*. 2010. Vol. 31. №6. P. 655-669. <https://doi.org/10.1080/09593331003610907>
21. Zhang J., Xu Y., Wu Y., Hu S., Zhang Y. Dynamic characteristics of heavy metal accumulation in the farmland soil over Xiaqingling gold-mining region, Shaanxi, China // *Environmental Earth Sciences*. 2019. Vol. 78. №1. P. 25. <https://doi.org/10.1007/s12665-018-8013-2>

REFERENCES

1. Deryabin, D.G., Aleshina, E.S., Deryabina, T.D., & Efremova, L.V. (2011). Biologicheskaya aktivnost' ionov, nano-i mikrochastits Cu i Fe v teste ingibirovaniya bakterial'noi bioluminestsentsii. *Voprosy biologicheskoi, meditsinskoi i farmatsevticheskoi khimii*, (6), 31-36. (in Russ.).
2. Alves, P.R.L., Bandeira, F.O., Giraldo, M., Presotto, R., Segat, J.C., Cardoso, E.J.B.N., & Baretta, D. (2019). Ecotoxicological assessment of Fluazuron: effects on *Folsomia candida* and *Eisenia andrei*. *Environmental Science and Pollution Research*, 26(6), 5842-5850. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-4022-7>
3. Bauer-Hilty, A., Dallinger, R., & Berger, B. (1989). Isolation and partial characterization of a cadmium-binding protein from *Lumbriculus variegatus* (Oligochaeta, Annelida). *Comp. Biochem. Physiol. C*, 94, 373-379. [https://doi.org/10.1016/0742-8413\(89\)90085-6](https://doi.org/10.1016/0742-8413(89)90085-6)
4. Böhmer, A., Jordan, J., & Tsikas, D. (2011). High-performance liquid chromatography ultraviolet assay for human erythrocytic catalase activity by measuring glutathione as o-phthalaldehyde derivative. *Analytical biochemistry*, 410(2), 296-303. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2010.11.026>
5. Brown, P.J., Long, S.M., Spurgeon, D.J., Svendsen, C., & Hankard, P.K. (2004). Toxicological and biochemical responses of the earthworm *Lumbricus rubellus* to pyrene, a non-carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbon. *Chemosphere*, 57(11), 1675-1681. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2004.05.041>
6. Chelikani, P., Fita, I., & Loewen, P. C. (2004). Diversity of structures and properties among catalases. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 61(2), 192-208. <https://doi.org/10.1007/s00018-003-3206-5>
7. Cortet, J., Gomot-De Vaufleury, A., Poinsot-Balaguer, N., Gomot, L., Texier, C., & Cluzeau, D. (1999). The use of invertebrate soil fauna in monitoring pollutant effects. *European Journal of Soil Biology*, 35(3), 115-134. [https://doi.org/10.1016/S1164-5563\(00\)00116-3](https://doi.org/10.1016/S1164-5563(00)00116-3)
8. Heath, R. L., & Packer, L. (1968). Photoperoxidation in isolated chloroplasts: I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives of biochemistry and biophysics*, 125(1), 189-198. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(68\)90654-1](https://doi.org/10.1016/0003-9861(68)90654-1)

9. Khan, S., & Şengül, H. (2016). Experimental investigation of stability and transport of TiO₂ nanoparticles in real soil columns. *Desalination and Water Treatment*, 57(54), 26196-26203. <https://doi.org/10.1080/19443994.2016.1163513>
10. Kool, P.L., Ortiz, M.D., & van Gestel, C.A. (2011). Chronic toxicity of ZnO nanoparticles, non-nano ZnO and ZnCl₂ to *Folsomia candida* (Collembola) in relation to bioavailability in soil. *Environmental Pollution*, 159(10), 2713-2719. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2011.05.021>
11. Lebedev, S., Yausheva, E., Galaktionova, L., & Sizova, E. (2016). Impact of molybdenum nanoparticles on survival, activity of enzymes, and chemical elements in *Eisenia fetida* using test on artificial substrata. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(18), 18099-18110. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-6916-6>
12. Liu, T., Zhu, L., Han, Y., Wang, J., Wang, J., & Zhao, Y. (2014). The cytotoxic and genotoxic effects of metalaxyl-M on earthworms (*Eisenia fetida*). *Environmental toxicology and chemistry*, 33(10), 2344-2350. <https://doi.org/10.1002/etc.2682>
13. Peakall, D., & Burger, J. (2003). Methodologies for assessing exposure to metals: speciation, bioavailability of metals, and ecological host factors. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 56(1), 110-121. [https://doi.org/10.1016/S0147-6513\(03\)00055-1](https://doi.org/10.1016/S0147-6513(03)00055-1)
14. Ravi Kiran, T., & Aruna, H.K. (2010). Antioxidant enzyme activities and markers of oxidative stress in the life cycle of earthworm, *Eudrilus eugeniae*. *Italian Journal of Zoology*, 77(2), 144-148. <https://doi.org/10.1080/11250000902932841>
15. Sanchez-Hernandez, J.C., Ro, K.S., & Díaz, F.J. (2019). Biochar and earthworms working in tandem: research opportunities for soil bioremediation. *Science of the total environment*, 688, 574-583. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.06.212>
16. Spurgeon, D.J., Hopkin, S.P., & Jones, D.T. (1994). Effects of cadmium, copper, lead and zinc on growth, reproduction and survival of the earthworm *Eisenia fetida* (Savigny): assessing the environmental impact of point-source metal contamination in terrestrial ecosystems. *Environmental pollution*, 84(2), 123-130. [https://doi.org/10.1016/0269-7491\(94\)90094-9](https://doi.org/10.1016/0269-7491(94)90094-9)
17. Sun, W., Tai, T.Y., & Lin, Y.S. (2007). Effect of monosultap on protein content. SOD and AChE activity of *Eisenia foetida* under two different temperatures. *J Agro-Environ Sci*, 26, 1816-1821.
18. Świątek, Z.M., van Gestel, C.A., & Bednarska, A.J. (2017). Toxicokinetics of zinc-oxide nanoparticles and zinc ions in the earthworm *Eisenia andrei*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 143, 151-158. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.05.027>
19. Tatsi, K., Shaw, B.J., Hutchinson, T.H., & Handy, R.D. (2018). Copper accumulation and toxicity in earthworms exposed to CuO nanomaterials: Effects of particle coating and soil ageing. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 166, 462-473. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.09.054>
20. Udovic, M., & Lestan, D. (2010). Redistribution of residual Pb, Zn, and Cd in soil remediated with EDTA leaching and exposed to earthworms (*Eisenia fetida*). *Environmental technology*, 31(6), 655-669. <https://doi.org/10.1080/09593331003610907>
21. Zhang, J., Xu, Y., Wu, Y., Hu, S., & Zhang, Y. (2019). Dynamic characteristics of heavy metal accumulation in the farmland soil over Xiaoqinling gold-mining region, Shaanxi, China. *Environmental Earth Sciences*, 78(1), 1-11. <https://doi.org/10.1007/s12665-018-8013-2>

дата поступления: 25.06.2021

дата принятия: 03.09.2021

© Вершинина И.А., Лебедев С.В., 2022