

УДК 595.142.39:574

**ТРОФОМЕТАБОЛИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ  
*EISENIA FETIDA* SAVIGNY, 1826 (OLIGOCHATA, LUMBRICIDAE),  
ОБУСЛОВЛЕННЫЙ ПРИСУТСТВИЕМ В ПОЧВЕ  
НАНОЧАСТИЦ МЕДИ И ЕЁ ОКСИДА**

**С. В. Лебедев<sup>1</sup>, Е. А. Сизова<sup>1,2</sup>, И. А. Гавриш<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> *Оренбургский государственный университет  
Россия, 460018, Оренбург, просп. Победы, 13*

<sup>2</sup> *Всероссийский НИИ мясного скотоводства  
Россия, 460000, Оренбург, 9 Января, 29  
E-mail: lsv74@list.ru*

Поступила в редакцию 20.02.16 г.

**Трофометаболический потенциал *Eisenia fetida* Savigny, 1826 (Oligochata, Lumbricidae), обусловленный присутствием в почве наночастиц меди и её оксида.** – Лебедев С. В., Сизова Е. А., Гавриш И. А. – В зависимости от концентрации наночастиц (НЧ) Cu и CuO (50, 100 и 500 мг/кг сухого вещества), вводимых в искусственную почву, эффект воздействия НЧ Cu на *Eisenia fetida* Savigny, 1826 намного сильнее, чем аналогичные дозы CuO. В частности, это выразилось в высокой смертности (80%) и снижении массы червя на 50% ( $p \leq 0.05$ ) при дозе НЧ Cu 500 мг/кг, тогда как аналогичная доза НЧ CuO не превышала предела валидности теста (20%). Установлена высокая степень аккумуляции меди в теле *E. fetida* при воздействии НЧ Cu, тогда как при экспозиции в среде в присутствии НЧ CuO накопление металла происходит до уровня 29 мг/кг с последующим его снижением. Активность антиоксидантных ферментов выражалась в снижении показателей малонового альдегида, супероксиддисмутазы и увеличения каталазы. В присутствии НЧ CuO активность ферментов имела противоположную реакцию.

*Ключевые слова:* *Eisenia fetida*, смертность, активность ферментов, скорость накопления, поглощение Cu.

**Trophometabolic potential of *Eisenia fetida* Savigny, 1826 (Oligochata, Lumbricidae) caused by copper nanoparticles and copper oxide in the soil.** – Lebedev S. V., Sizova E. A., and Gavrish I. A. – Depending on the concentrations of Cu and CuO nanoparticles (NPs) (50, 100 and 500 mg/kg dry matter) introduced into an artificial soil, the influence of Cu NPs upon *E. fetida* is much stronger than similar CuO doses. In particular, this was reflected in higher mortality (80%) and a 50% weight reduction of the worm ( $p \leq 0.05$ ) when the dose of Cu NPs was 500 mg/kg, whereas the validity limit of the test (20%) was not exceeded with a similar dose of CuO. Copper hyperaccumulation in the body of *E. fetida* under the influence of Cu NPs was noted, while at exposure in a medium with CuO NPs, copper accumulated up to a level of 29 mg/kg with subsequent reduction. As to the activity of antioxidant enzymes, the rates of malondialdehyde, superoxide dismutase decreased and that of catalase increased. The enzymatic activity was quite opposite in the presence of CuO NPs.

*Key words:* *Eisenia fetida*, mortality, enzyme activity, accumulation rate, Cu uptake.

DOI: 10.18500/1684-7318-2017-2-147-156

## ВВЕДЕНИЕ

Наночастицы (НЧ) в металлической и оксидной форме широко используются в различных производственных сферах, и их потенциал интродукции в почву и водную среду практически не раскрыт. В последние годы было установлено, что такие НЧ металлов, как Ag, Ti, Cu и их оксиды являются токсичными для растений (Lin, Xing, 2007), микробов (Adams et al., 2006), водных беспозвоночных (Lover, Klaper, 2006) и рыб (Handy et al., 2008). В то же время при низких концентрациях НЧ металлов могут оказывать и благоприятное действие. Тем не менее, при достаточно высоких уровнях все НЧ являются потенциально токсичными (опасными) для почвы и почвенных организмов, так как способны к накоплению в течение длительного времени (Garciga-Gomez et al., 2014).

Высокая степень взаимодействия между НЧ и почвой может значительно изменить их доступность за счет агрегации, освобождение иона металла, окисление и сорбцию почвой, что, свою очередь, может изменять токсичность НЧ (Pan, Xing, 2012). Экспериментально доказано, что биологические эффекты связаны не с общей концентрацией загрязняющего вещества в почве, а, скорее, с формой металла, которая является биологически доступной для почвенных организмов (Alexander, 2000). Биоаккумуляция включает процесс десорбции, физиологического поглощения и перераспределения в организме (Semenzin et al., 2007). Следовательно, необходимо установить отношения между доступностью металла почвой, накоплением тканями и токсичностью с тем, чтобы получить полное представление о последствиях загрязнения почв в окружающей среде.

Наряду со многими микроэлементами медь является одним из основных антропогенных загрязнителей среды (Покаржевский, 1985). В биотических концентрациях ее биологическая роль в почвообразовании и формировании ее физических свойств является неоспоримой, как и в жизнедеятельности почвенных беспозвоночных. Эти животные, в частности, дождевые черви, являются качественными биоиндикаторами загрязнения почвы, и посредством своей активности способны оказывать влияние на среду обитания и почвенные сообщества биоты, а также вызывать сукцессии экосистем (Lavelle et al., 2006; Eisenhauer, 2010; Jouquet et al., 2014). Кроме того, черви обладают специфической способностью регулировать концентрацию металлов в собственных тканях и органах, вследствие чего являются важным объектом для изучения механизмов миграции металлов в экосистеме.

Накопление химических веществ этими организмами может привести к прямому нарушению биологических процессов в почве и местного биоразнообразия косвенно, через передачу металлов дождевыми червями в организмы, населяющие разные трофические уровни (Morgan et al., 2001).

Целью данного исследования было выяснить адаптационно-приспособительные особенности организма червя *E. fetida* при экспозиции на искусственной почве с различной концентрацией наночастиц (НЧ) Cu и CuO. В частности, установить степень толерантности этого вида к различным концентрациям НЧ Cu и CuO и оценить способность его организма регулировать содержание металла и активность антиоксидантных ферментов.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В исследовании использовались наночастицы (НЧ) Cu и CuO, производства ООО «Передовые порошковые технологии» (Россия) (таблица).

Характеристика порошка наночастиц Cu и CuO, полученных методом плазмохимического синтеза

Вид наночастиц	Размер, нм	Химический и фазовый состав	Удельная поверхность ( $S_{уд}$ ), м <sup>2</sup> /г	Z-потенциал, мВ
Cu	55	99.7% масс. $\alpha$ - Cu, 0.3% - сорбированные газы (азот, углеводороды), вода	12	31±0.1
CuO	90	Оксид двухвалентной меди, CuO 99.6% масс	14	47±0.1

Материаловедческая аттестация препаратов включала: электронную сканирующую и просвечивающую микроскопию на приборах JSM 7401F и JEM-2000FX («JEOL», Япония). Рентгенофазовый анализ выполнен на дифрактометре ДРОН-7. Определение дзета-потенциала частиц проводилось на анализаторе Photocor Compact-Z (Россия).

Для исследований была приготовлена стандартизированная искусственная почва (OECD, 1984) путем смешивания 70% кварцевого песка (сухой вес), 20% каолина и 10% измельченного торфа (органический азот – 5.8%, рН была скорректирована до 6.0±0.5 порошкообразным карбонатом кальция (CaCO<sub>3</sub>)).

Исходные растворы НЧ (2 мл) были приготовлены методом, предложенным J. J. Scott-Fordsmand с соавт. (Scott-Fordsmand et al., 2008), путем добавления испытуемого металла в дионизированную воду (10 мл) с последующим диспергированием на ультразвуковом диспергаторе (f – 35 кГц, N – 300 Вт) в течение 30 минут. Впоследствии отдельные растворы, приготовленные для каждой повторности и концентрации, были смешаны с сухой искусственной почвой (100 г), затем их доводили дистиллированной водой до влажности 75 – 80% и перемешивали с помощью миксера.

Использованные в исследованиях черви *Eisenia fetida* были приобретены в ООО «БиОэра-Пенза» ([www.bioeragrup.ru](http://www.bioeragrup.ru)) и выращены в питомнике Лаборатории агроэкологии техногенных наноматериалов Всероссийского НИИ мясного скотоводства Россельхозакадемии (Оренбург, Россия). Червей культивировали в конском навозе без каких-либо лекарственных препаратов при 22±2°C. Перед постановкой на эксперимент червей промывали дистиллированной водой и помещали на 3 суток в пластиковые контейнеры с влажным субстратом из фильтровальной бумаги для очищения пищеварительного тракта (Dalby et al., 1996). По истечении 3 суток экспозиции на фильтровальной бумаге червей промывали и взвешивали.

Для каждого повтора отбирались половозрелые черви массой от 400 до 450 мг, из которых были сформированы 4 группы (n = 10): I группа – культивирование червей осуществлялось с добавлением НЧ в концентрации 50 мг/кг почвы; II – 100 мг/кг почвы; III – 500 мг/кг почвы; IV (контроль) – культивирование червей осуществлялось без внесения НЧ в субстрат. Червей помещали в пластиковые

контейнеры (0.4×0.15×0.02 м) с приготовленным субстратом по 10 штук. Все контейнеры были закрыты перфорированной крышкой для предотвращения потери влаги и выдерживались в темном месте (Тейлор и др., 2004).

Тест проводился в течение 14 суток, при температуре воздуха 22±2°C и температуре субстрата 25±2°C, в 5 повторностях.

В конце эксперимента червей отбирали, промывали дистиллированной водой и затем взвешивали. Содержимое пищеварительной системы удаляли путем рассечения пищеварительного тракта. Затем биосубстраты доводили в сушильном шкафу до постоянного веса. Сушеные образцы почвы и тканей червей использовали для определения металла на масс-спектрометре Agilent ICP-MS 7500 («Agilent Technologies», USA).

Определение антиоксидантной активности ферментов (каталаза (КТ, КФ 1.11.1.6), супероксиддисмутаза (СОД, КФ 1.15.1.1)) червей проводилось на автоматическом биохимическом анализаторе CS-T240 («Dirui Industrial Co., Ltd», Китай) с использованием коммерческих биохимических наборов Randox (США). Для этого готовились вытяжки из червей путем их гомогенизации в буферной (Tris 50 ммоль/л, DTT 1.0 ммоль/л, EDTA 1.0 ммоль/л, сахараза 250 ммоль/л, pH 7.5), которую добавляли в соотношении 1:9 (L.-Z. Li et al., 2011). Черви были гомогенизированы на гомогенизаторе тканей TissueLyser LT, QIAGEN («QIAGEN», Германия). Полученный гомогенат центрифугировали 10 мин при 15000 об./мин. Полученный супернатант разбавляли буферной смесью до 10% гомогената.

Рассчитывали поглощение металла:  $R = (M_a - M_b) / M_e * 100\%$ , где  $M$  – масса, мг,  $a$  – в конце эксперимента,  $b$  – в начале,  $e$  – масса червя (Zhang et al., 2013).

Скорость накопления Cu:  $S = \Delta C_{\text{червь}} / \Delta T = (C_{\text{червь}2} - C_{\text{червь}1}) / (t_2 - t_1)$ , (Zhang et al., 2009), где  $C_{\text{червь}}$  – концентрация вещества в черве в день выборки,  $t$  – дни выборки.

Все эксперименты обработаны методами вариационной статистики с использованием пакета компьютерных программ «Statistika» V8 («StatSoft Inc.», США).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Учитывая тот факт, что молярная концентрация Cu в субстрате соответствовала значениям 0.78, 1.56, 7.86 ммоль/кг, а CuO соответственно 0.65, 1.13, 6.5 ммоль/кг, то априори эффект воздействия НЧ Cu был сильнее, что выражалось в высокой смертности (80%) при дозе НЧ Cu 500 мг/кг, тогда как высокая концентрация НЧ CuO не превышала предела валидности теста (20%) (рис. 1).

Смертность является общепризнанным параметром оценки состояния популяции, но в нашем случае не отражает в полной мере причины ее вызывающие; поэтому были оценены другие сублетальные эффекты: изменения в массе тела и степень поглощения металла. Массу дождевых червей оценивали на 7-е и 14-е сутки экспозиции. Потеря веса была зафиксирована при всех дозировках. Причина потери веса была, во-первых, в недостатке органического вещества для червей (средне содержится 10% сфагнового торфа) и, во вторых, в снижении двигательной активности при высоких концентрациях НЧ Cu.

Если при максимальной концентрации Cu снижение массы червя составило 50% ( $p \leq 0.05$ ), то при аналогичной концентрации НЧ CuO – только на 28%. Инте-

ресно отметить, что при дозе 50 мг/кг установлен стимулирующий эффект, который выражался в достоверном превосходстве над контролем на 21.3%.

Дождевые черви в зависимости от дозы металла и времени экспозиции способны регулировать содержание химических веществ в своем организме (Van Gestel et al., 2009), тогда как для неспецифических элементов экскреция происходит медленнее, а в ряде случаев отсутствует. Для Cr, Cu, Ni, Zn в исследованиях W. J. G. M. Peijnenburg с соавт. (Peijnenburg et al., 1999) установлено быстрое поглощение и уравнивание в теле червя.

Нельзя пренебрегать и тем, что в условиях повышенного содержания токсического компонента включаются приспособительные реакции, которые выражаются в снижении двигательной активности, снижении питания, и единственным путем поглощения становится кожный маршрут, который, по мнению M. G. Vijver с соавт. (Vijver et al., 2003), является основным важным каналом забора водных ионов металлов из почвы. Поэтому для достижения высокой степени токсичности металла в организме червя необходимо выполнение ряда условий, стимулирующих его накопление.

Если первоначальное содержание Cu в черве составило 6.25 мг/кг НВ, то на 7-е сутки в присутствии НЧ Cu концентрация в черве увеличилась при дозе Cu 50 мг/кг на 65% (поглощение – 0.27 мг/%), при дозе 100 мг/кг – на 67% (поглощение – 0.28 мг/%), при дозе 500 мг/кг – на 78% (поглощение – 0.48 мг/%) (рис. 2). На 14-е сутки наибольшая аккумуляция металла зафиксирована в черве при концентрации НЧ Cu 100 и 500 мг/кг, что составило 91.9 и 89.2% при степени поглощения металла 1.3 и 0.8 мг/‰ соответственно (см. рис. 2).

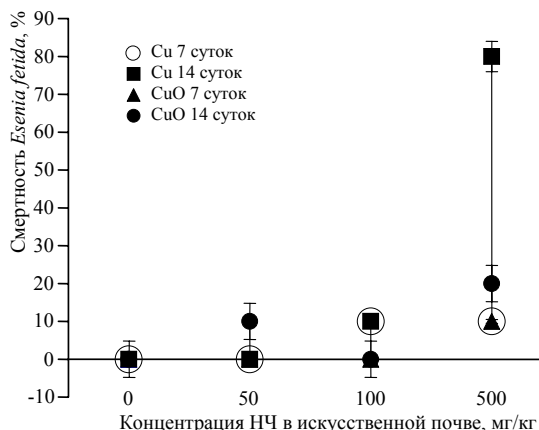


Рис. 1. Смертность червей *E. fetida* при воздействии наночастиц Cu и CuO на 7-е и 14-е сутки экспозиции в искусственной почве

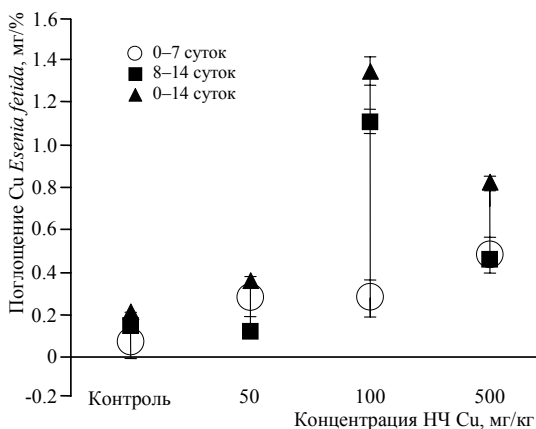
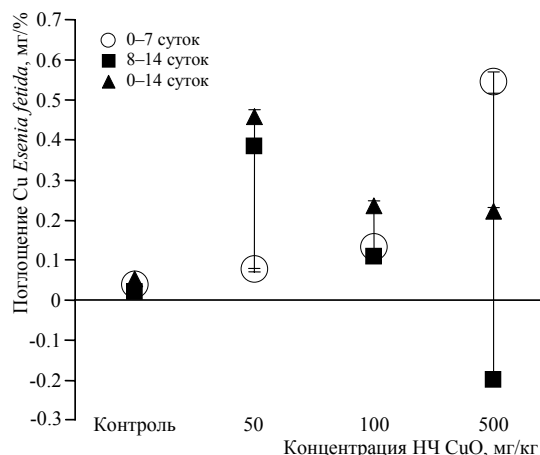


Рис. 2. Поглощение Cu *E. fetida* при экспозиции на искусственной почве с различной концентрацией НЧ Cu, мг/кг

Согласно S. Suthar с соавт. (Suthar et al., 2008), дождевые черви способны накапливать значительное количество металла в тканях, что может служить полезным индикатором биологического загрязнения из-за довольно последовательных отношений между концентрацией веществ в дождевом черве и почве.

Как и в результатах Z. Q. Li с соавт. (Li et al., 2009) и Y. G. Kou с соавт. (Kou et al., 2008), высокой гипераккумуляцией обладали НЧ Cu, суммарная скорость накопления которых достигала 5.08 и 3.69 мг/кг/сут. при дозах 100 и 500 мг/кг соответственно.

Различия по данному показателю в разрезе дозозависимых величин подтверждают мнения N. M. Van Straalen с соавт. (Van Straalen et al., 2001), S. N. Luoma, P. S. Rainbow (Luoma, Rainbow, 2005), которые считают, что скорость накопления металлов, а не абсолютные концентрации, являются ключевым показателем токсичности.



**Рис. 3.** Поглощение Cu червями *E. fetida* при экспозиции в искусственной почве с различной концентрацией НЧ CuO

свидетельствует о способности червя контролировать обмен высвобожденной меди, и опосредованно может снижать токсическую нагрузку на почвенный биоценоз при определенной степени загрязнения.

Учитывая, что механизмы снижения включают в себя увеличение скорости выведения при повышении концентрации в почве или токсикологический эффект, при котором увеличивается скорость метаболизма в черве при влиянии высоких концентраций металлов (Sample et al., 1998), то, если сравнить период 7-х и 14-х суток, концентрация меди в почве при добавлении НЧ Cu снизилась до 53%, а при добавлении НЧ CuO — до 29%.

Различная степень аккумуляции меди в организме червя оказала влияние на активность антиоксидантных ферментов в зависимости от концентрации наночастиц Cu и сроков экспозиции (Livingstone, 1993).

Между тем при введении в искусственную почву наночастиц CuO дозозависимый эффект проявлялся увеличением концентрации меди в теле червя на 12, 23 и 73% (7-е сутки) и на 62, 46 и 52% (14-е сутки) относительно контроля (см. рис. 2).

Интересно отметить, что накопление меди сохранилось при дозах до 100 мг/кг, тогда как при 500 мг/кг установлен факт выведения металла на 14-е сутки экспозиции (скорость выведения — 1.5 мг/кг/сут. (степень поглощения — 0.19 мг/%) (рис. 3).

При этом минимальная пороговая концентрация регуляции для CuO составила 29 мг/кг, что

Малоновый диальдегид (МА) отражает активность процессов перекисного окисления липидов и служит маркером степени эндогенной интоксикации. Как и в случае с НЧ Cu и CuO, увеличение МА было зафиксировано на 7-е сутки при снижении на 14-е сутки экспозиции. Как показано на рис. 4, наибольшее снижение на 75.8% установлено при концентрации НЧ Cu 500 мг/кг.

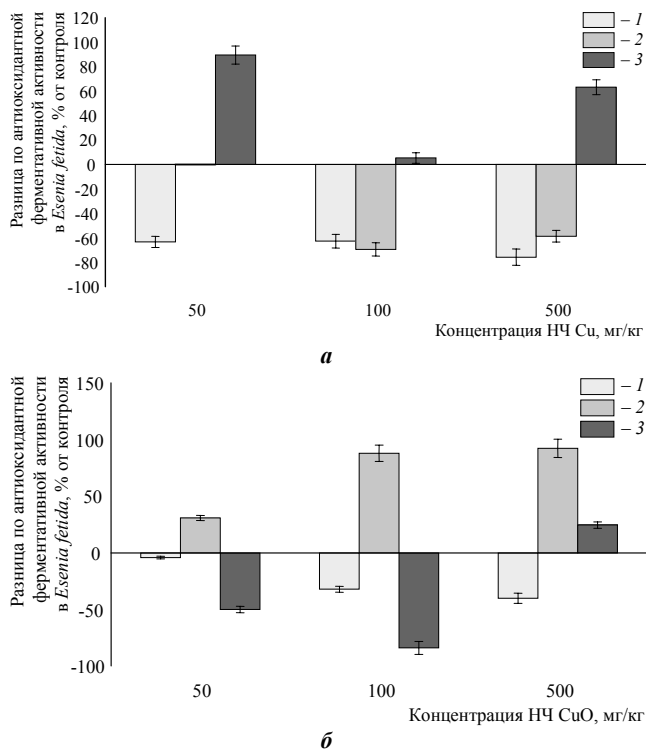
Каталаза (CAT) является важным ферментом в системе антиоксидантной защиты организмов. Способность исключать свободный радикал защищает клетки от повреждений, и его изменение рассматривается как предвестник загрязнения окружающей среды (Brown et al., 2004).

В присутствии НЧ Cu деятельность CAT в дождевом черве на 7-е сутки значительно подавлялась – до 14.1 и 25% ( $p < 0.05$ ) при дозе от 50 до 100 мг/кг соответственно, а затем увеличивалась до физиологического уровня после 14-дневного воздействия. Однако при дозе 500 мг/кг ее уровень увеличился от 29.4 до 63.1% относительно контроля.

Эффекты, вызываемые НЧ CuO, проявились в увеличении на 7-е сутки активности каталазы (на 71.7, 43.2, 63.5%) и в снижении на 14-е сутки экспозиции относительно контрольной группы (0 мг/кг) (рис. 4, б).

Аналогичные результаты были зарегистрированы в исследованиях М. Е. Wang, Q. X. Zhou (Wang, Zhou, 2006), Y. Liu с соавт. (Liu et al., 2010), D. H. Lin с соавт. (Lin et al., 2012). Это означает, что червь имеет способность переносить окислительный стресс и активировать антиоксидантную систему на первой стадии стресса при высоких концентрациях наночастиц.

Снижение активности CAT после длительного воздействия высоких концентраций наночастиц превышает пропускную способность поглощать активные



**Рис. 4.** Антиоксидантная ферментативная активность в *E. fetida* после 14-дневной экспозиции в искусственной почве с различной концентрацией НЧ Cu (а) и CuO (б) (разница с контролем, %): 1 – малоновый альдегид, мкМ/л; 2 – СОД, %; 3 – каталаза, мкМ/л

формы кислорода (АФК) САТ, и они становятся ингибиторами  $H_2O_2$  КПП. Это показывает, что защитные свойства антиоксидантных ферментов могут быть утеряны при увеличении токсического стресса в присутствии наночастиц меди.

В качестве другого ключевого фермента антиоксидантной защиты супероксиддисмутаза (СОД) удаляет супероксидный радикал  $O_2^-$ , образующийся при биологическом окислении.

В нашем исследовании активность СОД в черве снижалась при всех концентрациях НЧ Cu и, наоборот, увеличивалась в присутствии НЧ CuO. Влияние наночастиц Cu на активность СОД в дождевых червях проявилось в её снижении на 7-сутки независимо от концентрации, с наибольшим значением на 14-сутки при дозе 500 мг/кг (76.6%) относительно контрольной группы червей. В присутствии НЧ CuO ее уровень в черве увеличился относительно времени экспозиции от 20 до 50%.

Вышеописанные изменения могут произойти по той причине, что  $O_2$  снижает уровень радикалов, таких как OH до глутатиона (GSH) и глутатион S-трансферазы (GST), чтобы уменьшить активность СОД. Затем избыток  $O_2$  может снизить деятельность СОД и сделать её неактивной (Sun et al., 2007). По мнению того же автора, активность СОД в дождевом черве увеличивается при умеренном экологическом стрессе и уменьшается при тяжелом экологическом окружении. Из этого следует, что НЧ Cu обладают пролонгированным действием, и процесс релаксации системы к нормальному состоянию после исключения токсиканта может занять определенное время.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, изучен трофометаболический потенциал *Eisenia fetida*, обусловленный присутствием в почве наночастиц меди и её оксида. Установлено, что в отношении изучаемого объекта наибольшей токсичностью обладают НЧ меди, вызывающие высокие показатели смертности (80%), снижение массы на 50% ( $p \leq 0.05$ ) при дозировке НЧ Cu 500 мг/кг на фоне повышенной каталазы и низких значений малонового диальдегида и супероксиддисмутаза. Выявлен стимулирующий эффект минимальной из изучаемых дозировок НЧ CuO (50 мг/кг), что в перспективе может иметь прикладной характер. Проведенные эксперименты свидетельствуют о том, что высокая чувствительность представленных организмов позволяет использовать их в качестве биологических тестов (биоиндикаторов) с целью оценки состояния педосферы.

*Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 14-36-00023).*

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Покаржевский А. Д. Геохимическая экология наземных животных. М. : Наука, 1985. 302 с.
- Тейлор Д., Грин Н., Стаут У. Биология : в 3 т. / под ред. Р. Сопера. М. : Мир, 2004. Т. 2. С. 139.
- Adams L. K., Lyon D. Y., Alvarez P. J. J. Comparative eco-toxicity of nanoscale  $TiO_2$ ,  $SiO_2$ , and ZnO water suspensions // Water Research. 2006. Vol. 40, iss. 19. P. 3527 – 3532.



Alexander M. Aging, bioavailability, and overestimation of risk from environmental pollutants // Environmental Science Technology. 2000. Vol. 34, № 20. P. 4259 – 4265.

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. Vol. 57, № 11. P. 1675 – 1681.

Dalby P. R., Baker G. H., Smith S. E. «Filter paper method» to remove soil from earthworm intestines and to standardize the water content of earthworms // Soil Biology and Biochemistry. 1996. Vol. 28, iss. 4 – 5. P. 685 – 687.

Eisenhauer N. The action of an animal ecosystem engineer : identification of the main mechanisms of earthworm impacts on soil microarthropods // Pedobiologia. 2010. Vol. 53, iss. 6. P. 343 – 352.

García-Gómez C., Esteban E., Beatriz Sanchez-Pardo B., Dolores M. Assessing the ecotoxicological effects of long-term contaminated mine soils on plants and earthworms : relevance of soil (total and available) and body concentrations // Ecotoxicology. 2014. Vol. 23, iss. 7. P. 1195 – 1209.

Handy R. D., Henry T. B., Scown T. M., Johnston B. D., Tyler C. R. Manufactured nanoparticles : their uptake and effects on fish-a mechanistic analysis // Ecotoxicology. 2008. Vol. 17, iss. 5. P. 396 – 409.

Jouquet P., Blanchart E., Capowiez Y. Utilization of earthworms and termites for the restoration of ecosystem functioning // Applied Soil Ecology. 2014. Vol. 73. P. 34 – 40.

Kou Y. G., Fu X. Y., Hou P. Q. The study of lead accumulation of earthworm in lead pollution soil // Environmental Science and Management. 2008. Vol. 33, № 1. P. 62 – 64 (In Chinese).

Lavelle P., Decaëns T., Aubert M., Barot S., Blouin M., Bureau F., Margerie P., Mora P., Rossi J.-P. Soil invertebrates and ecosystem services // European J. of Soil Biology. 2006. Vol. 42, iss. 1. P. 3 – 15.

Li Z. Q., Wang B. B., Nie J. H. Effects of copper on earthworm in body weight and its copper accumulating characteristics // Acta Ecologica Sinica. 2009. Vol. 29. P. 1408 – 1414 (In Chinese).

Lin D. H., Xing B. S. Phytotoxicity of nanoparticles : inhibition of seed germination and root growth // Environmental Pollution. 2007. Vol. 150, iss. 2. P. 243 – 250.

Lin D., Xie X., Zhou Q., Liu Y. Biochemical and genotoxic effect of triclosan on earthworms (*Eisenia fetida*) using contact and soil tests // Environmental Toxicology. 2012. Vol. 27, iss. 7. P. 385 – 392.

Liu Y., Zhou Q., Xie X., Lin D., Dong L. Oxidative stress and DNA damage in the earthworm *Eisenia fetida* induced by toluene, ethylbenzene and xylene // Ecotoxicology. 2010. Vol. 19, № 8. P. 1551 – 1559.

Livingstone D. R. Biotechnology and pollution monitoring : use of molecular biomarkers in the aquatic environment // J. of Chemical Technology and Biotechnology. 1993. Vol. 57, iss. 3. P. 195 – 211.

Lover S. B., Klaper R. *Daphnia magna* mortality when exposed to titanium dioxide and fullerene (C-60) nanoparticles // Environmental Toxicology and Chemistry. 2006. Vol. 25, iss. 4. P. 1132 – 1137.

Luoma S. N., Rainbow P. S. Why is metal bioaccumulation so variable? Biodynamics as a unifying concept // Environmental Science and Technology. 2005. Vol. 39, iss. 7. P. 1921 – 1931.

Morgan J. E., Richards S. P. G., Morgan A. J. Stable strontium accumulation by earthworms : A paradigm for radiostromium interactions with its cation analogue, calcium // Environmental Toxicology and Chemistry. 2001. Vol. 20, iss. 6. P. 1236 – 1243.

Pan B., Xing B. S. Applications and implications of manufactured nanoparticles in soils : a review // European J. of Soil Science. 2012. Vol. 63, iss. 4. P. 437 – 456.

Peijnenburg W. J. G. M., Baerselman R., de Groot A. C., Jager T., Posthuma L., Van Veen R. P. M. Relating environmental availability to bioavailability : soil-type-dependent metal

accumulation in the oligochaete *Eisenia Andrei* // *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 1999. Vol. 44, iss. 3. P. 294 – 310.

Sample B. E., Beauchamp J. J., Efroymson R. A., Suter G. W., Ashwood T. L. Development and validation of bioaccumulation models for earthworms // *Environmental Restoration Program* / ed. M. Lockwood. Tennessee : Oak Ridge National Laboratory, 1998. 88 p.

Scott-Fordsmand J. J., Krogh P. H., Schaefer M., Johansen A. The toxicity testing of double-walled nanotubes-contaminated food to *Eisenia veneta* earthworms // *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2008. Vol. 71, iss. 3. P. 616 – 619.

Semenzin E., Critto A., Carlon C., Rutgers M., Marcomini A. Development of a site-specific ecological risk assessment for contaminated sites : part II. A multi-criteria based system for the selection of bioavailability assessment tools // *Science of the Total Environment*. 2007. Vol. 379, iss. 1. P. 34 – 45.

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 // *J. Agro-Environment Science*. 2007. Iss. 5. P. 1816 – 1821 (In Chinese).

Suthar S., Singh S., Dhawan S. Earthworm as bioindicators of metals (Zn, Fe, Mn, Cu, Pb and Cd) in soils : is metal bioaccumulation affected by their ecological categories // *Ecological Engineering*. 2008. Vol. 32, iss. 2. P. 99 – 107.

Van Gestel C. A. M., Koolhaas J. E., Hamers T., van Hopper M., van Roover M., Korsman C., Reinecke S. A. Effects of metal pollution on earthworm communities in a contaminated floodplain area : linking biomarker, community and functional responses // *Environmental Pollution*. 2009. Vol. 157, iss. 3. P. 895 – 903.

Van Straalen N. M., Butovsky R. O., Pokarzhevskii A. D., Zaitsev A. S., Verhoef S. C. Metal concentrations in soil and invertebrates in the vicinity of a metallurgical factory near Tula (Russia) // *Pedobiologia*. 2001. Vol. 45, iss. 5. P. 451 – 466.

Vijver M. G., Van Gestel C. A. M., Lanno R. P., Van Straalen N. M., Peijnenburg W. J. G. M. Internal metal sequestration and its ecotoxicological relevance : a review // *Environmental Science and Technology*. 2004. Vol. 38, iss. 18. P. 4705 – 4712.

Vijver M. G., Vink J. P. M., Miermans C. J. H., Van Gestel C. A. M. Oral sealing using glue : a new method to distinguish between intestinal and dermal uptake of metals in earthworms // *Soil Biology and Biochemistry*. 2003. Vol. 35, iss. 1. P. 125 – 132.

Wang M. E., Zhou Q. X. Joint stress of chlorimuron-ethyl and cadmium on wheat *Triticum aestivum* at biochemical levels // *Environmental Pollution*. 2006. Vol. 144, iss. 2. P. 572 – 580.

Zhang J., Yu J., Ouyang Y., Xu H. Responses of earthworm to aluminum toxicity in latosol // *Environmental Science and Pollution Research*. 2013. Vol. 20, iss. 3. P. 1135 – 1141.

Zhang B., Pan X., Cobb G. P., Anderson T. A. Uptake, bioaccumulation, and biodegradation of hexahydro-1, 3, 5-trinitro-1, 3, 5-triazine (RDX) and its reduced metabolites (MNX and TNX) by the earthworm (*Eisenia fetida*) // *Chemosphere*. 2009. Vol. 76, iss. 1. P. 76 – 82.