

ДЕГРАДАЦИЯ, ВОССТАНОВЛЕНИЕ И ОХРАНА ПОЧВ

УДК 631.453:574.23

ДОЖДЕВЫЕ ЧЕРВИ КАК БИОИНДИКАТОРЫ ЭКОЛОГИЧЕСКОГО СОСТОЯНИЯ ПОЧВ, ЗАГРЯЗНЕННЫХ ПРЕДПРИЯТИЯМИ МЕДНОДОБЫВАЮЩЕЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ В ЧИЛИ

© 2023 г. А. Неаман^а, *, К. Яньез^б

^аДепартамент природных ресурсов, Факультет сельскохозяйственных наук, Университет Тарапака, Арика, Чили

^бИнститут биологии, Папский католический университет Вальпараисо, Вальпараисо, Чили

*e-mail: alexander.neaman@gmail.com

Поступила в редакцию 25.04.2022 г.

После доработки 15.07.2022 г.

Принята к публикации 28.07.2022 г.

Почвенная фауна может служить эффективным инструментом для экологической оценки почв. Из организмов, используемых для анализа токсичности металлов, металлоидов и других поллютантов, особое место занимает навозный червь *Eisenia fetida* L. Многие исследования показывают, что концентрации металлов и металлоидов, оказывающиеся токсичными для дождевых червей, были на порядок ниже в искусственно загрязненных почвах, чем в техногенно загрязненных почвах. Новизна наших исследований заключается в использовании нативных техногенно загрязненных почв для получения оценок токсичности. Обобщены результаты двух экспериментов, демонстрирующие возможность использования навозного червя для экологической оценки почв, загрязненных металлами и металлоидами вследствие деятельности медных горнодобывающих предприятий в центральном районе Чили. Основным загрязнителем в этих почвах следует считать медь, однако мышьяк в загрязненных почвах также присутствует, поскольку он также обычно входит в состав медных руд. Установлено, что в краткосрочном тесте повышенное содержание меди предопределило избегание почв червями *E. fetida*. Однако в долгосрочных экспериментах более токсичным элементом для размножения червей оказался мышьяк, а эффект меди был менее выражен. Представлены результаты определения порогов токсичности меди и мышьяка для *E. fetida* в нативных техногенно загрязненных почвах.

Ключевые слова: токсичность, медь, мышьяк, *Eisenia fetida* L., зависимости доза-эффект, Dystric Arenosols, Eutric Fluvisols

DOI: 10.31857/S0032180X22600627, **EDN:** JKEXED

ВВЕДЕНИЕ

Почвенная фауна может служить эффективным инструментом для оценки качества почв [16, 26]. В частности, для анализа токсичности металлов, металлоидов и других поллютантов особое место занимает навозный червь *Eisenia fetida* L. [33]. Во-первых, с экологической точки зрения, этот вид считают репрезентативным для всей группы дождевых червей [31], которые играют ключевую роль в функционировании наземных экосистем [32]. Во-вторых, с практической точки зрения, данный вид гораздо удобнее, чем другие виды люмбрицид, для использования в тестах на токсичность, поскольку он легко культивируется, быстро достигает половой зрелости и хорошо размножается в лабораторных условиях [31]. Вследствие этого *Eisenia fetida* признан “стандартным видом” для тестирования токсичности и широко используется во многих исследованиях. В работе [18] показа-

но, что *Eisenia fetida* был не более, но и не менее чувствителен к химическим веществам, чем другие виды червей. Однако в других исследованиях было обнаружено, что данный вид менее чувствителен к цинку и свинцу по сравнению с другими видами дождевых червей [17, 42].

Многие исследования показывают, что концентрации металлов и металлоидов, оказывающиеся токсичными для дождевых червей, были на порядок ниже в искусственно загрязненных почвах, чем в техногенно загрязненных почвах [38]. Данное несоответствие связывают с тем, что токсичность зависит от времени пребывания металла в почвах, то есть процесса, называемого “старением”, для которого необходим длительный промежуток времени [24]. Несмотря на то, что многие исследователи декларируют важность проведения биотестирования с дождевыми червями в нативных техногенно (а не искусственно) загрязненных почвах для получения оценок токсично-

Таблица 1. Физико-химические характеристики тестируемых почв (медиана, в скобках — минимальное и максимальное значения)

Характеристика	<i>n</i> = 24 [5]	<i>n</i> = 52 [6]
ЭП, дСм/м (водная вытяжка 1 : 5)	—	0.3 (0.1–1.1)
ЭП, дСм/м (экстракт из водонасыщенной пасты)	0.23 (0.03–0.70)	1.9 (0.2–6.9)
pH (KNO ₃)	7.2 (5.7–7.6)	7.1 (5.7–8.3)
pCu ²⁺ (KNO ₃)	8.6 (6.8–9.8)	—
Органическое вещество, %	3.3 (0.7–5.8)	2.8 (0.7–10)
Валовый Cu, мг/кг	418 (82–1295)	118 (22–925)
Валовый As, мг/кг	21 (7–41)	14 (4.3–41)
Валовый Zn, мг/кг	152 (86–345)	122 (55–299)
Валовый Pb, мг/кг	44 (25–97)	33 (13–97)
Обменный Cu, мг/кг	0.20 (0.04–0.71)	—
Обменный As, мг/кг	0.022 (0.002–0.18)	—
Песок, %	53 (25–95)	52 (25–95)
Ил, %	15 (5–35)	18 (5.1–37)
Глина, %	29 (0–43)	28 (0–44)

Примечание. ЭП — удельная электропроводность. Прочерк означает отсутствие данных.

сти [28], в большинстве случаев такой подход остается лишь на уровне декларации и не реализуется на практике [37]. Именно поэтому новизна наших исследований заключается в использовании нативных техногенно загрязненных почв для получения оценок токсичности.

В данной работе обобщены результаты двух наших экспериментов [5, 6], демонстрирующих возможность использования навозного червя для экологической оценки почв, загрязненных металлами и металлоидами вследствие деятельности медных горнодобывающих предприятий в регионе Вальпараисо, который расположен в центральном районе Чили.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Основным загрязнителем в исследованных почвах следует считать медь [45], однако мышьяк также присутствует в загрязненных почвах, поскольку он обычно входит в состав медных руд [30]. В то же время медь является важным микроэлементом для всех организмов, но становится токсичной при превышении определенного порога, тогда как мышьяк не относится к эссенциальным элементам и потенциально токсичен для всех организмов, особенно для животных [1]. Хотя термин “тяжелый металл” очень широко используется в литературе, он не рекомендован Международным союзом теоретической и прикладной химии (IUPAC) [7]. Поэтому в данной работе мы используем термины “металл” (медь) и “металлоид” (мышьяк).

В работе были использованы аллювиальные почвы сельскохозяйственных земель в бассейне реки Аконкагуа; эти почвы диагностированы как Eutric Fluvisols [12]. Также использованы несельскохозяйственные почвы в бассейне р. Пучункави, сформировавшиеся на палеодюнах; эти почвы диагностированы как Dystric Arenosols [12]. Точки отбора проб выбраны так, чтобы обеспечить широкий диапазон валовых концентраций металлов в почвах [29, 44]. В первом и втором экспериментах использованы 52 и 24 сельскохозяйственные почвы соответственно (табл. 1). Для исследований отобран верхний слой каждой почвы (0–20 см). При этом важно отметить, что все образцы почв были протестированы нижеуказанными методами биотестирования.

В первом нашем эксперименте [6] в качестве ответного отклика было использовано избегание червями тестируемых субстратов в соответствии с ISO-17512-1 [11]. В данном тесте, продолжительность которого составляет 48 ч, червям предоставляется выбор для перемещения между тестируемой нативной почвой и контрольным искусственным субстратом. Таким образом, тест на избегание оценивает потенциальную пригодность почвы для обитания.

Важно подчеркнуть, что мы предложили внести определенные изменения в методику [6], поскольку в рекогносцировочных экспериментах было установлено, что избегание червями тестируемого субстрата предопределялось не только содержанием токсикантов, но также другими факторами — органическим веществом и удельной электропроводностью вытяжки из почвы.

В соответствии с этим, содержание органического вещества в искусственном субстрате изменялось за счет добавления торфа, а удельная электропроводность — раствора NaCl. При этом важно отметить, что внесение торфа и раствора NaCl в искусственный субстрат не влияло на тестируемую нативную почву.

Количество добавляемых торфа и раствора NaCl подбирали таким образом, чтобы соответствовать свойствам тестируемых нативных почв. Данная корректировка физико-химических свойств искусственного субстрата позволила устранить влияние мешающих факторов — органического вещества и удельной электропроводности вытяжки из почвы. Таким образом, усовершенствованный метод позволил корректно определить пороги токсичности.

Учитывая узкий диапазон значений pH (7.1 ± 0.7) в почвах в исследовании [6], pH не являлся мешающим фактором. Однако необходимы дальнейшие исследования преимуществ регулирования pH искусственного субстрата в случае тестирования почв с широким диапазоном значений pH. Также необходимы дальнейшие исследования преимуществ регулирования удельной электропроводности вытяжки из почвы другими солями (к примеру, морской солью) вместо NaCl.

Во втором эксперименте [5] в качестве ответного отклика использовали количество продуцируемых коконов, то есть интенсивность размножения. Взрослые особи червей были помещены в исследованные почвы на 4 недели, следуя методологии ISO 11268-2 [10]. Затем взрослые особи червей были перенесены на 24 ч на влажную фильтровальную бумагу для опорожнения кишечника от почвы; при этом бумагу заменяли каждые 6 ч [2]. После этого было определено содержание элементов в тканях червей, на основании чего идентифицированы элементы, которые определяли токсичность техногенно загрязненных почв для червей [27].

Важно подчеркнуть, что мы используем термин “концентрация” для жидкой фазы почвы (в данной работе — для солевой вытяжки) и термин “содержание” для твердой фазы почвы и для тканей дождевых червей [8]. В работе был использован 0.1 M раствор KNO_3 для приготовления солевой вытяжки.

Были определены концентрации Cu и As в 0.1 M экстракте KNO_3 (соотношение почва/раствор 1/2.5) [43]. Активность Cu^{2+} определяли в том же экстракте с помощью ионоселективного электрода [34]. Результаты выражали в виде $p\text{Cu}^{2+}$, который является отрицательным логарифмом активности свободного иона Cu^{2+} . Для определения валового содержания Cu, Pb, Zn и As образцы выдерживали в кипящей азотной кислоте с последующим добавлением хлорной кислоты [23] с

использованием тefлоновой пробки со стеклянной рефлюксной трубкой длиной 30 см для предотвращения улетучивания As во время процесса кислотного разложения [35]. Остальные химические характеристики почв определяли с использованием стандартных методов [36]. Гранулометрический состав был определен методом ареометра в упрощенном варианте [40].

Выполнен регрессионный анализ между биологическими реакциями и физико-химическими характеристиками почв [15]. Во втором эксперименте также выполнен регрессионный анализ между биологическими реакциями и содержанием металлов и металлоидов в тканях червей. Статистический анализ проведен с использованием Minitab 18.

Для расчета эффективных концентраций, уменьшающих отклик на 50% относительно контроля (то есть EC_{50}), использовали нелинейный регрессионный анализ с помощью программы анализа токсичности Агентства по охране окружающей среды США [46]. Важно отметить, что фоновые содержания меди и мышьяка в незагрязненных почвах области Вальпараисо составляют 134 и 13 мг/кг соответственно [29]. Таким образом, для расчета эффективных концентраций за 100% приняты отклики червей в почвах с валовыми содержаниями меди менее 134 мг/кг и мышьяка менее 13 мг/кг.

ПОРОГИ ТОКСИЧНОСТИ МЕДИ В ТЕСТЕ ИЗБЕГАНИЯ

В исследовании [6] избегание навозного червя определялось валовым содержанием меди в почве, в то время как влияние других элементов (Pb, Zn и As) и других пулов меди было статистически незначимым. Этот результат важен, поскольку позволяет определить пороги токсичности. Данный результат согласуется с заключением нашего анализа имеющихся литературных данных [37], который показывает, что валовые концентрации металлов могут прогнозировать реакции организмов также хорошо, как и биодоступные фракции.

Избегания навозного червя не наблюдалось в почвах с валовым содержанием меди менее 155 мг/кг. Этот результат не согласуется с исследованием [3], в котором наблюдалось избегание навозных червей в почвах с валовым содержанием меди около 110 мг/кг. Однако это несоответствие, скорее всего, объясняется повышенной токсичностью металлов в почвах, искусственно загрязненных $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$, которые были использованы в исследовании [3]. Наш эксперимент более релевантен с экологической точки зрения, поскольку в нем использовались техногенно загрязненные почвы [28].

Согласно критерию ISO-17512-1 [11], почва считается непригодной для обитания, если ее из-

Таблица 2. Пороговые значения токсичности (мг/кг), снижающие отклик на 50% (EC_{50}), для валового содержания меди в почве

Исследование	Вид	Отклик червей	EC_{50}
[6]*	<i>Eisenia fetida</i>	Избегание	213
[47]	<i>Eisenia fetida</i>	Избегание	131
[39]	<i>Eisenia fetida</i>	Репродукция	340
[25]	<i>Aporrectodea tuberculata</i>	Репродукция	220
[14]	<i>Enchytraeus crypticus</i>	Репродукция	351
[22]	<i>Enchytraeus crypticus</i>	Репродукция	439

* Наш эксперимент.

Таблица 3. Пороговые значения токсичности валового содержания мышьяка в почве, а также содержания мышьяка в тканях *Eisenia fetida* для репродуктивного теста (в скобках – 95%-ный доверительный интервал)

Параметр	EC_{10}	EC_{25}	EC_{50}
Валовое содержание As в почве, мг/кг	8 (0–21)	14 (7–22)	22 (17–26)
Содержание As в тканях <i>Eisenia fetida</i> , мг/кг	38 (24–53)	47 (38–56)	57 (51–62)

бегают более 80% червей. В эксперименте валовое содержание меди, при котором 80% червей избегали тестируемую почву, оказалось равным 433 мг/кг (при 95%-ном доверительном интервале 339–528 мг/кг). Таким образом, валовое содержание меди более 339 мг/кг лимитирует обитание червей в почве. Близкие значения получены в полевом исследовании [9] в Дании, в котором медь была единственным загрязняющим элементом в почве, и в котором биомасса и плотность популяции дождевых червей уменьшилась при валовых содержаниях меди выше 300 мг/кг. Как в цитируемой работе в Дании, так и в настоящем эксперименте металлы находились в исследуемых почвах в течение нескольких десятилетий.

Важно отметить, что существует очень мало работ по изучению нативных техногенно загрязненных почв, в которых пороги валового содержания меди были определены при использовании червей как биоиндикаторов (табл. 2) [37]. Столь небольшое число работ, которые даже в минимальной степени не охватывают реального разнообразия природных ситуаций, не позволяет пока выйти на формулирование широких обобщений.

ПОРОГИ ТОКСИЧНОСТИ МЫШЬЯКА В РЕПРОДУКТИВНОМ ТЕСТЕ

Пошаговый регрессионный анализ показал статистически незначимое влияние различных почвенных пулов свинца и цинка на количество продуцируемых коконов. Аналогичным образом статистически незначимым ($p > 0.05$) было и влияние содержаний свинца и цинка в тканях червей. В свою очередь, линейный регрессионный анализ показал, что количество коконов связано с валовым

содержанием мышьяка в почве ($R^2 = 0.52$, $p < 0.05$) и с содержанием мышьяка в тканях *Eisenia fetida* ($R^2 = 0.45$, $p < 0.05$). Однако эти зависимости лучше аппроксимируются сигмоидальными кривыми [46], которые позволили оценить эффективные концентрации (табл. 3).

В свою очередь, концентрация меди в 0.1 М KNO_3 вытяжке слабо коррелировала с количеством коконов ($R^2 = 0.25$, $p < 0.05$). Влияние других почвенных пулов меди (активность свободного иона Cu^{2+} в солевой вытяжке и валовое содержание меди в почве) было статистически незначимым ($p > 0.05$). Также было статистически незначимым влияние содержания меди в тканях *Eisenia fetida* в простой регрессии ($p > 0.05$) и минимально значимым ($p = 0.05$) – в следующей множественной регрессии: количество коконов = $15.8 - 0.15 As$ в тканях червей – $0.05 Cu$ в тканях червей, $R^2 = 0.58$.

Учитывая, что в изученных почвах мышьяк и медь не коррелировали друг с другом, можно сделать вывод, что в данном случае мышьяк является наиболее токсичным элементом для навозного червя, в то время как медь проявляла вторичный эффект. Эти результаты несколько неожиданные, поскольку предполагалось, что медь будет наиболее токсичной в почвах, загрязненных выбросами медной горнодобывающей промышленности.

В работе [5] был рассчитан коэффициент биоконцентрации для *Eisenia fetida* (отношение содержания элемента в тканях к его содержанию в почве). Среднее значение коэффициента биоконцентрации для мышьяка составило 3.2, для меди – 0.15, что может означать более высокую токсичность мышьяка по сравнению с медью для

рассматриваемого вида. Аналогичным образом, в работе [13] значение коэффициента биоконцентрации для близкого вида *Eisenia andrei* (в ряде работ рассматриваемого как подвид *Eisenia fetida*) было выше для мышьяка по сравнению с медью. Возможно, данный факт связан с тем, что концентрация меди в тканях *Eisenia fetida* может регулироваться гомеостатическими механизмами элиминации данного элемента [41], тогда как в работе [19] сообщается об отсутствии элиминации мышьяка видом *Eisenia fetida* при внесении загрязненных червей в чистую почву, вероятно, из-за образования в тканях червя тиоловых соединений с мышьяком. Отсутствие элиминации мышьяка видом *Eisenia fetida* аналогично другим неэссенциальным элементам (таким как, например, кадмий и свинец), тогда как для меди и других эссенциальных элементов выявлено быстрое выведение из организма *Eisenia fetida* [41].

В работе [19] показано, что As(III) был более токсичен для *Eisenia fetida* по сравнению с As(V). Нами [48] было установлено, что в почвах области Вальпараисо доли As(V) и As(III) составляли $75 \pm 12\%$ и $12 \pm 6\%$ от валового содержания мышьяка в почве. Таким образом, полученные пороговые значения токсичности для содержания валового мышьяка в почве в основном соответствуют содержанию As(V). Важно подчеркнуть, что результаты нашего исследования представляют новые данные для оценки порогов токсичности мышьяка для *Eisenia fetida*, поскольку в известной нам литературе отсутствует информация о порогох токсичности мышьяка для дождевых червей в нативных техногенно загрязненных почвах.

Полученные пороговые значения токсичности для валового содержания мышьяка в почве существенно отличаются от известных порогов токсичности мышьяка для *Eisenia fetida*, полученных в экспериментах с искусственно загрязненными почвами. Например, авторы работы [20] показали, что LC_{50} составляет 5.9 мг/кг для валового содержания мышьяка в искусственно загрязненной почве при длительности эксперимента 4 недели, тогда как в нашем случае при той же длительности эксперимента при таких содержаниях мышьяка летальных эффектов не наблюдалось. Аналогичным образом в исследовании [21] EC_{50} для валового содержания мышьяка в почве и репродуктивного теста составляла 11 мг/кг, тогда как в нашем случае для такой величины эффекта было обнаружено значительно более высокое значение валового содержания мышьяка в почве (22 мг/кг).

В одном из наших исследований [4] результаты электронно-зондового микроанализа показали, что основные фазы-носители мышьяка в сельскохозяйственных почвах области Вальпараисо — это малорастворимые оксиды железа и сульфиды меди. В то же время в вышеупомянутых исследо-

ваниях с искусственно загрязненными почвами в почву добавляли растворимые соли (арсенат калия или натрия). Логично предположить, что различие в растворимости фаз-носителей мышьяка объясняет несоответствие между ранее установленными пороговыми значениями токсичности мышьяка для *Eisenia fetida* в искусственно загрязненных почвах и нашими результатами с нативными техногенно загрязненными почвами. Таким образом, искусственно загрязненные почвы не могут адекватно отражать реальные условия окружающей среды и, следовательно, имеют ограниченную значимость с экологической точки зрения.

ВЫВОДЫ

В краткосрочном тесте повышенное содержание меди предопределило избегание червями *Eisenia fetida* почв, загрязненных выбросами медной горнодобывающей промышленности. Однако в долгосрочных экспериментах более токсичным элементом для размножения червей оказался мышьяк, а эффект со стороны меди был менее выражен. Таким образом, несмотря на полиэлементный характер загрязнения исследованных почв, на основе химического анализа тканей дождевых червей можно идентифицировать элементы, которые в первую очередь определяют токсичность техногенно загрязненных почв.

Загрязнение почв — один из основных аргументов для принятия решений об использовании территорий, в том числе о необходимости ремедиации, рекультивации или полной утилизации и замене грунта, что имеет заметный экономический эффект. По мнению авторов, любые нормативные акты должны проводить четкое различие между почвами, в которых металлы присутствуют, но не представляют риска, и теми, которые при аналогичном валовом содержании металлов действительно несут значительную экологическую опасность. Результаты данной работы предоставляют необходимую информацию по такому разграничению для почв из области Вальпараисо, Чили. Полученная информация может быть использована в прикладных целях — для оценки и управления рисками техногенно загрязненных почв.

БЛАГОДАРНОСТЬ

Авторы выражают благодарность Е.Л. Воробейчику за ценные замечания. Также авторы благодарят А.Л. Саврову за правку русского текста.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Adriano D.C. Trace Elements in Terrestrial Environments: Biogeochemistry, Bioavailability, and Risk of Metals New York, N.Y.: Springer-Verlag, 2001.
2. Arnold R.E., Hodson M.E. Effect of time and mode of depuration on tissue copper concentrations of the earthworms *Eisenia andrei*, *Lumbricus rubellus* and *Lumbricus terrestris* // Environmental Pollution. 2007. V. 148. P. 21–30.
<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2006.11.003>
3. Arnold R.E., Hodson M.E., Black S., Davies N.A. The influence of mineral solubility and soil solution concentration on the toxicity of copper to *Eisenia fetida* Savigny // Pedobiologia. 2003. V. 47. P. 622–632.
[https://doi.org/10.1016/s0031-4056\(04\)70246-2](https://doi.org/10.1016/s0031-4056(04)70246-2)
4. Ávila G., Gaete H., Morales M., Neaman A. Reproducción de *Eisenia fetida* en suelos agrícolas de áreas mineras contaminadas por cobre y arsénico. // Pesqui Agropecu Bras. 2007. V. 42. P. 435–441.
<https://doi.org/10.1590/S0100-204X2007000300018>
5. Bustos V., Mondaca P., Sauvé S., Gaete H., Celis-Diez J.L., Neaman A. Thresholds of arsenic toxicity to *Eisenia fetida* in field-collected agricultural soils exposed to copper mining activities in Chile // Ecotoxicology and Environmental Safety. 2015. V. 122. P. 448–454.
<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.09.009>
6. Delgadillo V., Verdejo J., Mondaca P., Verdugo G., Gaete H., Hodson M.E., Neaman A. Proposed modification to avoidance test with *Eisenia fetida* to assess metal toxicity in agricultural soils affected by mining activities // Ecotoxicology and Environmental Safety. 2017. V. 140. P. 230–234.
<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.02.038>
7. Duffus J.H. “Heavy metals” a meaningless term? (IUPAC Technical Report) // Pure and Applied Chemistry. 2002. V. 74. P. 793–807.
<https://doi.org/10.1351/pac200274050793>
8. Fuentes-Arderiu X. Concentration and content // Biochemia Medica. 2013. V. 23. P. 141–142.
<https://doi.org/10.11613/bm.2013.017>
9. Holmstrup M., Hornum H.D. Earthworm colonisation of abandoned arable soil polluted by copper // Pedobiologia. 2012. V. 55. P. 63–65.
<https://doi.org/10.1016/j.pedobi.2011.08.005>
10. ISO 11268-2. Soil quality – Effects of pollutants on earthworms. Part 2: Determination of effects on reproduction of *Eisenia fetida*/*Eisenia andrei* Genève, Switzerland: International Organization for Standardization, 2012. 21 p.
11. ISO-17512-1. Soil quality – Avoidance test for determining the quality of soils and effects of chemicals on behaviour. Part 1: Test with earthworms (*Eisenia fetida* and *Eisenia andrei*); Geneva, Switzerland, 2008.
12. IUSS Working Group WRB. World Reference Base for Soil Resources 2014, update 2015. International soil classification system for naming soils and creating legends for soil maps. World Soil Resources Reports No. 106 Rome: Food and Agricultural Organization, 2015. 192 p.
13. Janssen R.P.T., Posthuma L., Baerselman R., DenHollander H.A., vanVeen R.P.M., Peijnenburg J.G.M. Equilibrium partitioning of heavy metals in Dutch field soils. II. Prediction of metal accumulation in earthworms // Environmental Toxicology and Chemistry. 1997. V. 16. P. 2479–2488.
<https://doi.org/10.1002/etc.5620161207>
14. Konečný L., Ettler V., Kristiansen S., Barros Amorim M.J., Kříbek B., Mihaljevič M., Šebek O., Nyambe I., Scott-Fordsmand J. Response of *Enchytraeus crypticus* worms to high metal levels in tropical soils polluted by copper smelting // J. Geochemical Exploration. 2014. V. 144. P. 427–432.
<https://doi.org/10.1016/j.gexplo.2013.10.004>
15. Kutner M., Nachtsheim C., Neter J. Applied Linear Regression Models Boston: McGraw-Hill Education, 2004. 701 p.
16. Kuznetsova A.I., Lukina N.V., Tikhonova E.V., Gornov A.V., Gornova M.V., Smirnov V.E., Geraskina A.P., Shevchenko N.E., Tebenkova D.N., Chumachenko S.I. Carbon Stock in Sandy and Loamy Soils of Coniferous-Broad-leaved Forests at Different Succession Stages // Eurasian Soil Sci. 2019. V. 52. P. 756–768.
<https://doi.org/10.1134/s1064229319070081>
17. Langdon C.J., Hodson M.E., Arnold R.E., Black S. Survival, 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 // Environmental Pollution. 2005. V. 138. P. 368–375.
<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2005.03.002>
18. Laskowski R., Kramarz P., Jepsen P. Selection of species for soil ecotoxicity testing. // Handbook of Soil Invertebrate Toxicity Tests. John Wiley & Sons: Chichester, England, 1998. P. 21–40.
19. Lee B.-T., Kim K.-W. Toxicokinetics and biotransformation of As(III) and As(V) in *Eisenia fetida* // Hum. Ecol. Risk Assess. 2013. V. 19. P. 792–806.
<https://doi.org/10.1080/10807039.2012.708285>
20. Lee B.T., Kim K.W. Lysosomal membrane response of earthworm, *Eisenia fetida*, to arsenic contamination in soils // Environmental Toxicology. 2009. V. 24. P. 369–376.
<https://doi.org/10.1002/tox.20441>
21. Lock K., Janssen C.R. Toxicity of arsenate to the compostworm *Eisenia fetida*, the potworm *Enchytraeus albidus* and the springtail *Folsomia candida* // Bull. of Environmental Contamination and Toxicology. 2002. V. 68. P. 760–765.
<https://doi.org/10.1007/s001280320>
22. Maraldo K., Christensen B., Strandberg B., Holmstrup M. Effects of copper on enchytraeids in the field under differing soil moisture regimes // Environmental Toxicology and Chemistry. 2006. V. 25. P. 604–612.
<https://doi.org/10.1897/05-076R.1>
23. Maxwell J.A. Rock and Mineral Analysis. N.Y.: Interscience Publishers, 1968. 584 p.
24. McBride M.B., Cai M.F. Copper and zinc aging in soils for a decade: changes in metal extractability and phytotoxicity // Environmental Chemistry. 2016. V. 13. P. 160–167.
<https://doi.org/10.1071/en15057>
25. Mirmonsef H., Hornum H.D., Jensen J., Holmstrup M. Effects of an aged copper contamination on distribution of earthworms, reproduction and cocoon hatchability // Ecotoxicology and Environmental Safety.

2017. V. 135. P. 267–275.
<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2016.10.012>
26. *Nadporozhskaya M.A., Bykhovets S.S., Abakumov E.V.* Application of the ROMUL Mathematical Model for Estimation of CO₂ Emission and Dynamics of Organic Matter in the Subantarctic Lithozems // *Eurasian Soil Sci.* 2022. V. 55. P. 413–424.
<https://doi.org/10.1134/s1064229322040123>
 27. *Nahmani J., Hodson M.E., Black S.* Effects of metals on life cycle parameters of the earthworm *Eisenia fetida* exposed to field-contaminated, metal-polluted soils // *Environmental Pollution.* 2007. V. 149. P. 44–58.
<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2006.12.018>
 28. *Nahmani J., Hodson M.E., Black S.* A review of studies performed to assess metal uptake by earthworms // *Environmental Pollution.* 2007. V. 145. P. 402–424.
<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2006.04.009>
 29. *Neaman A., Valenzuela P., Tapia-Gatica J., Selles I., Novoselov A.A., Dovletyarova E.A., Yanez C., Krutyakov Y.A., Stuckey J.W.* Chilean regulations on metal-polluted soils: The need to advance from adapting foreign laws towards developing sovereign legislation // *Environmental Research.* 2020. V. 185. P. 109429.
<https://doi.org/10.1016/j.envres.2020.109429>
 30. *O'Neill P.* Arsenic // *Heavy Metals in Soils.* 2nd ed.; Blackie Academic & Professional: London, UK, 1995. P. 105–121.
 31. OECD-222. Guidelines for the testing of chemicals. Earthworm Reproduction Test (*Eisenia fetida*/*Eisenia andrei*); 2074–5761; Organisation for Economic Cooperation and Development: 2016.
 32. *Pezzotti D., Peli M., Sanzeni A., Barontini S.* Seasonality of Earthworm Macropores in a Temperate Alpine Area // *Eurasian Soil Sci.* 2021. V. 54. P. 1935–1944.
<https://doi.org/10.1134/S1064229321130032>
 33. *Pukalchik M.A., Terekhova V.A., Karpukhin M.M., Vavilova V.M.* Comparison of Eluate and Direct Soil Bioassay Methods of Soil Assessment in the Case of Contamination with Heavy Metals // *Eurasian Soil Sci.* 2019. V. 52. P. 464–470.
<https://doi.org/10.1134/s1064229319040112>
 34. *Rachou J., Gagnon C., Sauvé S.* Use of an ion-selective electrode for free copper measurements in low salinity and low ionic strength matrices // *Environmental Chemistry.* 2007. V. 4. P. 90–97.
<https://doi.org/10.1071/EN06036>
 35. *Sadzawka A., Carrasco M.A., Demanet R., Flores H., Mora M.L., Neaman A., Hernández P., Sandoval M.* Métodos de análisis de lodos y de suelos. Chillán: Sociedad Chilena de la Ciencia del Suelo. Universidad de Concepción, 2015. 114 p.
 36. *Sadzawka A., Carrasco M.A., Grez R., Mora M.L., Flores H., Neaman A.* Métodos de análisis recomendados para los suelos de Chile. Serie actas INIA № 34 Santiago, Chile: Instituto de Investigaciones Agropecuarias, 2006. 164 p.
 37. *Santa-Cruz J., Peñaloza P., Korneykova M.V., Neaman A.* Thresholds of metal and metalloid toxicity in field-collected anthropogenically contaminated soils: A review // *Geography, Environment, Sustainability.* 2021. V. 14. P. 6–21.
<https://doi.org/10.24057/2071-9388-2021-023>
 38. *Santa-Cruz J., Vasenev I.I., Gaete H., Peñaloza P., Krutyakov Y.A., Neaman A.* Metal ecotoxicity studies with spiked versus field-contaminated soils: Literature review, methodological shortcomings and research priorities // *Russian J. Ecology.* 2021. V. 52. P. 478–484.
<https://doi.org/10.1134/S1067413621060126>
 39. *Scott-Fordsmand J.J., Weeks J.M., Hopkin S.P.* Importance of contamination history for understanding toxicity of copper to earthworm *Eisenia fetida* (Oligochaeta: Annelida), using neutral-red retention assay // *Environmental Toxicology and Chemistry.* 2000. V. 19. P. 1774–1780.
<https://doi.org/10.1002/etc.5620190710>
 40. *Sheldrick B.H., Wang C.* Particle size distribution // *Soil Sampling and Methods of Analysis.* Canadian Society of Soil Science, Lewis Publishers: Boca Raton, FL, USA, 1993. P. 499–511.
 41. *Spurgeon D.J., Hopkin S.P.* Comparisons of metal accumulation and excretion kinetics in earthworms (*Eisenia fetida*) exposed to contaminated field and laboratory soils // *Appl Soil Ecol.* 1999. V. 11. P. 227–243.
[https://doi.org/10.1016/S0929-1393\(98\)00150-4](https://doi.org/10.1016/S0929-1393(98)00150-4)
 42. *Spurgeon D.J., Weeks J.M.* Evaluation of factors influencing results from laboratory toxicity tests with earthworms // *Advances in earthworm ecotoxicology.* SETAC Technical Publications Series: Pensacola, FL, USA, 1998. P. 15–25.
 43. *Stuckey J.W., Neaman A., Ravella R., Komarneni S., Martínez C.E.* Highly charged swelling mica reduces free and extractable Cu levels in Cu-contaminated soils // *Environmental Science & Technology.* 2008. V. 42. P. 9197–9202.
<https://doi.org/10.1021/es801799s>
 44. *Tapia-Gatica J., González-Miranda I., Salgado E., Bravo M.A., Tessini C., Dovletyarova E.A., Paltseva A.A., Neaman A.* Advanced determination of the spatial gradient of human health risk and ecological risk from exposure to As, Cu, Pb, and Zn in soils near the Ventanas Industrial Complex (Puchuncaví, Chile) // *Environmental Pollution.* 2020. V. 258. P. 113488.
<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.113488>
 45. *Tapia-Gatica J., Selles I., Bravo M.A., Tessini C., Barros-Parada W., Novoselov A., Neaman A.* Global issues in setting legal limits on soil metal contamination: A case study of Chile // *Chemosphere.* 2022. V. 290. P. 133404.
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.133404>
 46. *US EPA.* Toxicity Relationship Analysis Program (TRAP) version 1.3 United States Environmental Protection Agency, Mid-Continent Ecology Division, 2016.
 47. *Van Zwieten L., Rust J., Kingston T., Merrington G., Morris S.* Influence of copper fungicide residues on occurrence of earthworms in avocado orchard soils // *Science of the Total Environment.* 2004. V. 329. P. 29–41.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2004.02.014>
 48. *Vargas C., Quiroz W., Bravo M., Neaman A.* Stability of arsenic during soil treatment and storage // *J. the Chilean Chemical Society.* 2015. V. 60. P. 2868–2871.
<https://doi.org/10.4067/S0717-97072015000300015>

Assessment of the Ecological Status of Soils Contaminated by the Copper Mining Industry in Chile: Earthworms to the Rescue

A. Neaman^{1, *} and C. Yáñez²

¹*Departamento de Recursos Ambientales, Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad de Tarapacá, Arica, 1000000 Chile*

²*Instituto de Biología, Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, Valparaíso, 2340000 Chile*

**e-mail: alexander.neaman@gmail.com*

Soil fauna can serve as an excellent tool for ecological assessment of soil quality. The earthworm *Eisenia fetida* L. is widely used as a bioindicator organism to assess the toxicity of metals, metalloids, and other pollutants. Many studies have shown that the concentrations of metals and metalloids toxic to earthworms are an order of magnitude lower in artificially contaminated soils than in industrially contaminated soils. The novelty of this study is that toxicity estimates were made using native industrially contaminated soils. The results of the two experiments demonstrate the potential use of earthworms for ecological assessment of soils contaminated with metals and metalloids due to copper mining activities in central Chile. The main contaminant in these soils was copper, but arsenic, commonly found in copper ore, was also present in the contaminated soils. In the short-term bioassay, *E. fetida* earthworms avoided the soil in response to increasing copper content. However, in long-term experiments, arsenic proved to be more toxic to earthworm reproduction, while copper had little effect. In this study, we present toxicity thresholds for copper and arsenic to *E. fetida* in industrially contaminated native soils.

Keywords: toxicity, copper, arsenic, *Eisenia fetida* L., dose-response relationships, Dystric Arenosols, Eutric Fluvisols