



VYTAUTO DIDŽIOJO UNIVERSITETAS

GAMTOS MOKSLŲ FAKULTETAS

APLINKOTYROS KATEDRA

Irmida Norkevičiūtė

**KADMIO IR ŠVINO POVEIKIS SLIEKO (*EISENIA FETIDA*)
FIZIOLOGINIAMS, BIOCHEMINIAMS RODIKLIAMS IR SLIEKŲ
GEBĖJIMAS ATSISTATYTI PO POVEIKIO**

Magistro baigiamasis darbas

Aplinkosaugos organizavimo studijų programa, valstybinis kodas 621F70002

Aplinkotyros studijų kryptis

Vadovė: dr. Jūratė Žaltauskaitė

(Moksl. laipsnis, vardas, pavardė) (Parašas) (Data)

Apginta: doc. dr. Saulius Mickevičius

(Fakulteto dekanas, vardas, pavardė) (Parašas) (Data)

Kaunas, 2017

TURINYS

SANTRAUKA	3
SUMMARY	4
ĮVADAS	5
1. LITERATŪROS APŽVALGA.....	6
1.1. Kadmio ir švino šaltiniai aplinkoje	6
1.2. Kadmio ir švino toksiškumas	7
1.3. Kadmio ir švino poveikio sliekų augimui, išgyvenamumui, reprodukcijai tyrimų apžvalga	9
1.4. Oksidacinio streso sukelti biocheminiai pokyčiai.....	13
1.5. Sliekų gebėjimas atsistatyti po poveikio teršalais.....	16
2. METODIKA	19
2.1. Tyrimo metodika.....	19
2.2. Statistinė duomenų analizė.....	21
3. REZULTATAI IR JŲ ANALIZĖ	22
3.1. Kadmio poveikis kompostinio sliekų (<i>Eisenia fetida</i>) fiziologiniams rodikliams.....	22
3.2. Švino poveikis kompostinio sliekų (<i>Eisenia fetida</i>) fiziologiniams rodikliams	28
3.3. Kompostinio sliekų (<i>Eisenia fetida</i>) fiziologinių rodiklių atsistatymas po perkėlimo į kadmio neužterštą dirvožemį.....	33
3.4. Kompostinio sliekų (<i>Eisenia fetida</i>) fiziologinių rodiklių atsistatymas po perkėlimo į švinu neužterštą dirvožemį.....	39
3.5. Kadmio ir švino bioakumuliacija sliekų audiniuose ir metalų koncentracijų sliekuose pokytis atsistatymo periodu.....	43
3.6. Kadmio poveikis kompostinio sliekų (<i>Eisenia fetida</i>) biocheminiams rodikliams ir jų atsistatymas.....	46
3.7. Švino poveikis kompostinio sliekų (<i>Eisenia fetida</i>) biocheminiams rodikliams ir jų atsistatymas.....	48
IŠVADOS.....	51
LITERATŪRA.....	53

SANTRAUKA

Kadmis ir švinas yra toksiški sunkieji metalai į aplinką patenkantys tiek iš natūralių tiek iš antropogeninių šaltinių. Dėl didelio šių metalų toksiškumo ir plataus jų paplitimo vis didesnis dėmesys skiriamas taršos kontrolei, analizuojamas dirvožemio organizmų gebėjimas atsistatyti po poveikio metalais. Taigi, šio darbo tikslas įvertinti kadmio ir švino poveikį *Eisenia fetida* sliekų fiziologiniams ir biocheminiams rodikliams, nustatyti sliekų gebą atsistatyti po poveikio metalais.

Kadmio ir švino poveikio sliekams *Eisenia fetida* fiziologiniams ir biocheminiams rodikliams tyrimas buvo atliekamas pagal OECD 222 metodiką. Tyrimo metu sliekai *Eisenia fetida* buvo 56 dienas veikiami skirtingomis švino (40, 250, 500, 1000, 2500 mg Pb/kg) ir kadmio (5, 10, 100, 250, 500 mg Cd/kg) koncentracijomis. Po 56 dienų poveikio sliekai perkelti į švarų (metalais neužterštą) dirvožemį ir stebėti 56 dienas. Augimas ir išgyvenamumas buvo vertinamas kas 14 dienų, reprodukcija, bioakumuliacija ir antioksidacinių fermentų (SOD ir CAT) aktyvumas vertinamas po 56 dienų poveikio ir po 56 dienų atsistatymo.

Ilgėjant poveikio laikui ir veikiant vis didesnėmis metalų koncentracijomis sliekų išgyvenamumas mažėjo ir buvo mažesnis lyginant su kontroline grupe. Didžiausią neigiamą poveikį sliekų svariui darė 500 mg Cd/kg kadmio ir 40 mg Pb/kg švino koncentracijos. Abu tirti metalai neigiamai veikė reprodukciją, kokonų ir jauniklių skaičius buvo statistiškai reikšmingai mažesnis lyginant su kontroline grupe ($p < 0,05$). Atsistatymo laikotarpiu tik buvusios kadmio koncentracijos mažino gyvų sliekų skaičių (pirmas 14 dienų), o švinas veikimo laikotarpiu įtakos išgyvenamumui neturėjo. Perkeltų į švarų dirvožemį sliekų svoris ėmė augti greičiau, lyginant su poveikio laikotarpiu. Ypač spartus svorio augimas buvo pastebėtas tų organizmų, kurie poveikio laikotarpiu buvo veikti didžiausiomis kadmio koncentracijomis (250 ir 500 mg Cd/kg) ir mažiausia švino (40 mg Pb/kg) koncentracija, tačiau vis dėlto sliekų svoris išliko statistiškai reikšmingai mažesnis lyginant su kontroline grupe ($p < 0,05$). Perkėlus sliekus į švarų dirvožemį užfiksuota ir intensyvesnė reprodukcija, tačiau kokonų ir jauniklių skaičius kontrolės lygio nepasiekė. Vertinant metalų poveikį antioksidaciniams fermentams nustatyta, kad švinas įtakos fermentų veiklai neturėjo, o kadmis sukėlė oksidacinį stresą dėl kurio padidėjo fermentų aktyvumas. Paveikus visomis kadmio koncentracijomis, išskyrus 10 ir 100 mg Cd/kg koncentracijas, sliekų fermentų aktyvumas buvo didesnis lyginant su kontroline grupe. Po atsistatymo beveik visomis buvusiomis kadmio koncentracijomis veiktų sliekų fermentų aktyvumas sumažėjo, tačiau buvusios koncentracijos turėjo reikšmingą poveikį aktyvumui. Mažomis kadmio koncentracijomis veikti sliekai atsistatė lengviau nei veikti didelėmis kadmio koncentracijomis.

Raktiniai žodžiai: kadmis, švinas, sliekas, išgyvenamumas, augimas, reprodukcija, fermentai, atsistatymas.

SUMMARY

Cadmium and lead are toxic heavy metals entering the environment from natural and anthropogenic sources. Because of the high toxicity of these metals and their expanded distribution increasingly focused on pollution control, analysis of soil organisms the ability to recover from effects of metals. The purpose of this master is to assess the effects of cadmium and lead on the earthworm *Eisenia fetida* physiological and biochemical parameters, determine the earthworm ability to recover from impact of metals.

Effects of cadmium and lead on the physiological and biochemical parameters of earthworm (*Eisenia fetida*) was conducted according to OECD 222 guidelines. The earthworms were grown for 56 days in the soils amended with lead (40, 250, 500, 1000, 2500 mg Pb/kg) and cadmium (5, 10, 100, 250, 500 mg Cd/kg) concentrations. After 56 days exposure of metals earthworms were replaced to the clean (not metals polluted) soil and then they were following 56 days. Effects of growth and survival rates were measured every 14 days. Reproduction, bioaccumulation and antioxidant enzymes (SOD and CAT) activity measured after 56 days of exposure and 56 days after recovery.

The results of the experiment showed that earthworms survival decreased, accordingly increasing exposure time and exposure to increasingly higher concentrations of metals. And finally, it was lower compared to the control group. It was observed that decrease of earthworms weight was noticeable during 500 mg Cd/kg cadmium and 40 mg Pb/kg lead concentrations. Both metals had negative effects of reproduction, cocoons and juveniles numbers were significantly lower compared to the control group ($p < 0,05$). Recovery period, only previous cadmium concentration reduced the number of earthworms (first 14 days), the lead did not affect survival. After replaced to the clean soil earthworms weight began to grow faster as compared with the exposure period. Previous biggest cadmium (250 and 500 mg Cd/kg) and less lead (40 mg Pb/kg) concentrations were best of grown in recovery period, but earthworms weight was significantly lower compared with the control group ($p < 0,05$). The reproduction of the recovery has been more intensive than after exposure metals, but cocoons and juveniles number level of control not reached. In assessing the impact of metals had showed that lead did not affect the enzyme activity, and cadmium caused by oxidative stress due to the increased enzymes activity. Under the effect of all the cadmium concentrations, except 10 and 100 mg Cd/kg concentrations, the activity of enzymes were increased and enzymes activity were significantly biggest compared with the control group ($p < 0,05$). After recovery the activity of enzymes were decreased, but previous cadmium concentration had significant effect on the activity. Recovery was better after exposure small concentrations of cadmium than operate large concentrations of cadmium.

Keywords: cadmium, lead, earthworm, survival, growth, reproduction, enzymes, recovery.

IVADAS

Dirvožemio tarša sunkiaisiais metalais yra laikoma viena svarbiausių ekologinių problemų. Galima išskirti vietinius (transportas, pramonės ir energetikos įmonės) ir paskliduosius taršos šaltinius (žemės ūkio veikla). Iš šių šaltinių į aplinką patekę sunkieji metalai veikia ne tik dirvožemį, vandenį, atmosferą, bet ir florą, fauną ir net žmogų. Metalų toksiškumas priklauso nuo jų cheminės formos ir koncentracijos. Kai kurie metalai mažomis koncentracijomis yra netgi naudingi, tačiau kadmio, chromo, švino, gyvsidabrio ir nikelio net mažomis koncentracijomis yra toksiški.

Literatūroje minima, kad sunkieji metalai silpnina imunitetą, skatina įvairių ligų prasiveržimą, vystymosi, augimo sutrikimus, pažeidžia reprodukcines funkcijas, sukelia mutageninį bei kancerogeninį efektą ar netgi mirtį. Po poveikio sunkiaisiais metalais dirvožemio organizmai patiria oksidacinį stresą, kuriam nustatyti naudojami biožymenys. Jų pagalba nustatomi galimi fiziologinio ar patologinio proceso redokso komponentai ir įvertinamas toksinės medžiagos poveikio stiprumas ir progresavimas.

Dėl didelio užterštumo sunkiaisiais metalais vis didesnis dėmesys skiriamas taršos kontrolei, todėl svarbu išsiaiškinti organizmų gebėjimą atsistatyti po perkėlimo į švaresnius, metalais neužterštus dirvožemius. Būtina ištirti organizmų funkcijų savireguliacijos ir stabilizavimosi procesus.

DARBO TIKSLAS – įvertinti kadmio ir švino poveikį *Eisenia fetida* sliekų fiziologiniams ir biocheminiams rodikliams, nustatyti sliekų gebą atsistatyti po poveikio metalais.

DARBO UŽDAVINIAI:

1. Nustatyti kadmio ir švino poveikį kompostinio sliekų *Eisenia fetida* išgyvenamumui, augimui ir reprodukcijai;
2. Įvertinti kompostinio sliekų *Eisenia fetida* išgyvenamumo, augimo ir reprodukcijos atsistatymą, po perkėlimo į kadmio ir švino neužterštus dirvožemius;
3. Išanalizuoti kadmio ir švino įtaką antioksidacinio streso fermentams (superoksido dismutazei ir katalazei);
4. Įvertinti fermentų gebą atsistatyti, po perkėlimo į kadmio ir švino neužterštus dirvožemius.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1. Kadmio ir švino šaltiniai aplinkoje

Sunkiesiems metalams, tarp jų švinui ir kadmiui, patekus į aplinką yra paveikiami visi aplinkos komponentai: tiek negyvieji (oras, vanduo ir dirvožemis), tiek gyvieji (augalai ir gyvūnai). Ypač didelį susirūpinimą Europos Sąjungoje kelia dirvožemio tarša sunkiaisiais metalais. Apie 3,5 mln. ES vietų kenčia nuo šios taršos ir net 0,5 mln. vietų yra kritinės būklės. Kadmio, švino ir kiti metalai yra sutrikdę dirvožemio fizikines, chemines ir biologines funkcijas bei patį dirvožemio derlingumą (Adomaitis ir kt., 2003; Gutiérrez et al., 2016; Mahar et al., 2016).

Į aplinką kadmio ir švino patenka iš vietinių ir pasklidusios taršos šaltinių. Natūralus (gamtinis) sunkiųjų metalų šaltinis yra dirvodarinė uoliena, taip pat dideli kiekiai sunkiųjų metalų į aplinką patenka išsiveržus ugnikalniams, vykstant gaisrams (Briat, Lebrun et al., 1999).

Daug didesni kiekiai kadmio ir švino į aplinką patenka iš antropogeninių šaltinių (Jung, 2008). Pagrindiniais antropogeniniais metalų šaltiniais galima laikyti: kasybą, gamybą, sintetinių produktų naudojimą, sąvartynus, miesto nuotekas, transportą. Be to, vis dažniau išskiriama sunkiųjų metalų kiekio didėjimo problema dėl nuotekų dumblo taikymo žemės ūkio srityse (Silveira et al., 2003). Metalurgijos ir chemijos pramonėje kasmet naudojama vis daugiau švino, kadmio, chromo, nikelio, gyvsidabrio ir kitų metalų (Briat, Lebrun ir et al., 1999).

H. B. Bradl (2005) pateikė apskaičiuotas metines sunkiųjų metalų (Cd, Pb, Zn ir Cu) emisijas atmosferoje. Antropogeninės emisijos viršino gamtines. Gamtinės kadmio emisijos - $0,29 \cdot 10^3$ t/m, švino - $4 \cdot 10^3$ t/m, vario - $19 \cdot 10^3$ t/m, cinko - $36 \cdot 10^3$ t/m, antropogeninės atitinkamai - $5,5 \cdot 10^3$ t/m, $400 \cdot 10^3$ t/m, $260 \cdot 10^3$ t/m, $840 \cdot 10^3$ t/m. Didžioji dalis emisijų nusėda kritulių pavidalu ant dirvos paviršiaus, o vėliau vandens pagalba patenka ir į gilesnius dirvožemio sluoksnius.

Per paskutinį šimtmetį daugelyje pasaulio šalių kadmio kiekis ore, vandenyje bei dirvožemyje padidėjo net kelis kartus, tai lėmė žemės ūkio ir pramonės veika, pavyzdžiui, trąšų, fungicidų, nuotekų dumblo naudojimo, galvanizavimo, gumos, plastikų, dažų, tekstilės, variklinės alyvos gamybos bei kasybos (Galunin et al., 2014; Bergwist et al., 2003).

Švinas į aplinką gali patekti iš pramoninių šaltinių, dažų gamyklų. Taip pat nemaži kiekiai patenka iš guolių, šaudmenų, litavimo, iš spaustuvių. Taip pat sieros rūgšties gamykloje naudojami švininiai rezervuarai bei kiti įrengimai (Mažvila ir kt., 2001; Cheng et al., 2010).

1.2. Kadmio ir švino toksiškumas

Tarša sunkiaisiais metalais gali pakeisti dirvožemio ekosistemas kokybiškai ir kiekybiškai bei sutrikdyti ne tik dirvožemio floros, bet ir faunos veiklą, sąlygoti augimo ir vystymosi sutrikimus, paveikti reprodukciją, lyčių santykį, didinti mirtingumą. Nuo sunkiųjų metalų gali priklausyti dirvožemio pH, katijonų mainų geba, organinės medžiagos kiekis ir dirvožemio struktūra (Jung, 2008). Be to, dirvožemio bestuburiais besimaitinantys plėšrūnai taip pat gauna tam tikrą kiekį sunkiųjų metalų per maisto grandinę (Dube et al., 2001; Pen-Mouratov et al., 2008).

Žinant, kad terminas sunkieji metalai reiškia bet koki metalinį cheminį elementą, turintį santykinai aukštą tankį, ir pasižymintį toksiškumu arba nuodingumu esant net mažoms koncentracijoms, galima išskirti daugybę kadmio ir švino neigiamų funkcijų (Kumar et al., 2015).

Kadmis ir švinas priskiriami I toksiškumo klasei, tai susiję su metalų bioakumuliacija ir stabilumu. Nustatyta, kad didėjant metalų atominiam svoriui metalų toksiškumas auga, tokiu atveju kadmis turėtų būti toksiškesnis metalas nei švinas, tačiau toksiškumas gali priklausyti ne tik nuo atominio svorio, bet ir nuo koncentracijos, cheminio junginio formos ir nuo to su koku gamtiniu junginiu chemiškai fiziškai sąveikauja. Sąveika su įvairiais junginiais gali padidinti arba sumažinti jų mobilumą. Apskritai daugelyje dirvožemių metalų koncentracija svyruoja priklausomai nuo geologinės aplinkos ir natūralios aplinkos bei antropogeninės veiklos (Dube et al., 2001).

Kadmio ir švino kaupimasis ir prieinamumas dirvožemyje priklauso nuo to, kiek šių metalų yra dirvožemio tirpale, koks dirvožemio rūgštumas (pH), sorbcijos galia, oksidacinio – redukcinio potencialo, bei kiek dirvožemyje yra organinės medžiagos, fosfato ir karbonatinių junginių, nuo ligandų kiekio (Conder, Lanno, 2000; Ali et al., 2004).

Adsorbciją ir desorbciją galima laikyti svarbiausiais cheminiais procesais, kontroliuojančiais kadmio ir švino mobilumą ir biologinį prieinamumą. Adsorbcija susijusi su metalų kaupimu, prisijungimu prie kietų koloidinių dirvos dalelių paviršių, bei migracijos procesų nutraukimu. Metalai pašalinami iš dirvožemio tirpalo, o vėl randami jame tik tada, kai yra desorbuojami, t.y. atskiriami. Desorbuoti metalai vėl gali migruoti ir būti biologiškai prieinami (Silveira et al., 2003).

Kadmis ir švinas yra metalai, kurių poveikis pasireiškia ne iš karto paveikus, o per tam tikrą laiką. Šie metalai gali sukelti sunkius biocheminius, fiziologinius pokyčius ir paveikti organizmų reprodukciją. Galimas oksidacinis stresas, pakeičiama genų ekspresiją, sukeliama DNR pažeidimai, pakeičiamas fermentų aktyvumas ir sutrikdoma maistinių medžiagų įsisavinimas ir translokacija įvairiuose dirvožemio organizmuose (Regoli et al., 2006). Literatūroje minima, kad kadmis ir švinas gali netiesiogiai neigiamai paveikti antioksidantų ląsteles (Espin et al., 2014).

Metallų poveikis ir bioakumuliacija priklauso nuo veikiamo organizmo individualių biologinių savybių. Pavyzdžiui, nustatyta, kad įprastai mėsėdžiuose žinduoliuose kadmio koncentracija yra aukštesnė nei žolėdžiuose, o sliekuose kadmio koncentracija didesnė nei augaluose (Smith et al., 2010).

Kadmis laikomas ne tik kancerogenišku ir mutagenišku, bet šį metalą kai kurie autoriai mini kaip labiausiai toksišką iš visų aplinkos teršalų, sukeliančiu neigiamą poveikį žmonėms ir gyvūnams, taip pat kadmis neigiamai veikia dirvožemio mikroorganizmus ir jų fermentų veiklą (Yan et al., 2013). Nors šis metalas pasižymi tokiu dideliu toksiškumu, tam, kad jo poveikis pasireikštų reikalingas ilgesnis laiko tarpas kaip ir daugeliui kitų metallų (Doull, Klaassen, 1980).

Kadmis dėl savo judrumo lengvai išstumia H^+ protonus iš neutralių tirpių humuso prisotintų dirvožemių, o tai sąlygoja rūgštėjimo procesą. Šis metalas pasižymi tirpumu, todėl geba kauptis ne tik sliekų, bet ir kitų dirvožemio bestuburių minkštuosiuose audiniuose. Kadmio kiekiai gyvūnuose gali būti didesni nei dirvožemyje ar augaluose ir gali priklausyti nuo jų buvimo užterštame dirvožemyje trukmės. Lietuvos etaloniniuose dirvožemiuose kadmio randama: smėliuose ir priesmėliuose 0,5 mg/kg, moliuose ir priemoliuose šiek tiek daugiau - 0,6 mg/kg. (Eitminavičiūtė ir kt., 2002). Didžiausia kadmio leistina koncentracija (DLK) pagal HN 60:2004 higienos normas yra 3 mg/kg. Foninės medžiagos kiekis smėlio ir priesmėlio dirvožemyje yra 0,15 mg/kg, priemolio ir molio dirvožemyje šiek tiek didesnis - 0,2 mg/kg (HN 60:2004).

Pagal L. Z. Li et al. (2010) net mažos kadmio koncentracijos gali sukelti detoksikacijos mechanizmų suaktyvėjimą. Detoksikacija yra susijusi su metalotioneinų indukcija, padidėjusia metallų surišimo su baltymais galimybe slieko organizme. Metalotioneinai skatina organizmo apsaugą nuo toksinio poveikio, padaro toksiinę medžiagą nebeaktyvia, taip sumažinamas poveikis sliekams ir sliekų mirtingumas. D. J. Spurgeon et al. (1994) atlikto chroniško toksiškumo bandymo metu sliekai *Eisenia fetida* buvo veikiami skirtingomis kadmio koncentracijomis (5 mg Cd/kg, 20 mgCd/kg, 80 mg Cd/kg ir 300 mg Cd/kg). Per visą eksperimento laikotarpį (56 dienas) didžiausias mirtingumas nustatytas 20 mg Cd/kg koncentracijoje (10 %), o pačioje didžiausioje 300 mg Cd/kg koncentracijoje mirusių individų nebuvo rasta.

Kai kurie autoriai kadmį išskiria kaip mažiau toksišką metalą lyginant su švinu. A. A. Olajire et al. (2003) užteršto dirvožemio Pietų Nigerijoje tyrimų metu nustatė, kad kadmį galima laikyti mažiau mobiliu ir biologiškai prieinamu lyginant su kitais metalais. Pačiu didžiausiu mobilumu ir biologiniu prieinamumu pasižymėjo švinas ($Pb > Zn > Cu > Ni > Cd$).

Švino koncentracijos yra ribojamos higienos normomis, kurias reglamentuoja HN 60:2004. Didžiausia leistina švino koncentracija (DLK) dirvožemyje yra 100 mg/kg, o foninis cheminės medžiagos kiekis smėlio ir priesmėlio, molio ir priemolio dirvožemyje 15 mg/kg (HN 60:2004).

Šis sunkusis metalas linkęs kauptis bei sukelti neigiamą poveikį aplinkai ir organizmams. Jis slopina organizmų daugelio fermentų veiklą, neigiamai veikia biologines membranas, lipidų peroksidų susidarymą (Saint-Denis et al., 2001). Gali sukelti mirtingumą, reprodukcinį nepakankamumą, sukelia daugybę neurologinių efektų, indukuoja metalų gebėjimą surišti baltymus, sukelia histopatologinius pokyčius ir DNR pažeidimus (Santoyo et al., 2011).

Švinas sukelia didelį stresą dirvožemio organizmams, kurį išgyventi ir prisitaikyti reikalingas didelis energijos kiekis. Dėl šios priežasties daug mažesnis energijos kiekis tenka reprodukcijai ir somatinių ląstelių augimui. Be to, stresoriai gali sukelti biocheminius, apsauginių funkcijų pakitimus ir kitus gyvavimo ciklo parametrų pokyčius (Morgan et al., 1999).

S. Maity et al. (2008) tyrime minima, kad švinas nepasižymi jokiais naudingomis funkcijomis sliekų organizme. Paveikus suaugusį slieką net mažomis švino koncentracijomis (75, 150, 300 mg/Pb kg) antioksidantinių fermentų (glutathiono, glutathiono - S – transferazės) poveikis buvo stebimas jau pirmomis dienomis. Kai tuo tarpu paveikus cinku (tokiomis pačiomis koncentracijomis) poveikis pasireiškė tik po 14 dienų, pačioje didžiausioje (300 mg Zn/kg) koncentracijoje. J. Žaltauskaitės ir I. Sodienės (2014) tyrime nustatyta, kad veikiant ilgesnį laiką ir didinant švino koncentracijas (20-2500 mg Pb/kg) sliekų jauniklių išgyvenamumo tikimybė mažėja. D. J. Spurgeon (1994) šviną apibūdino, kaip mažiausiai mirtingumą sukeliančiu metalu, lyginant su kadmiumu, variu ir cinku, todėl didžiausias mirtingumas buvo pasiektas tik veikiant 10000 mg Pb/kg koncentracija.

Aprašomi du pagrindiniai metalų detoksikacijos mechanizmai: metalai gali būti saugomi organelėse arba jie gali būti surišti į specialius baltymus – metalotioneinus (MT) ir padaromi toksiškai neaktyvūs. Metalai skiriasi savo galimybe detoksikuotis ir kauptis pavienėse ląstelėse. Kadmis, labiausiai ištirtas toksinis metalas, yra žinomas kaip metalas indukuojantis MT produkciją su kuriais po to pats jungiasi, sudarydamas kadmio ir MT kompleksą. Priešingai nei kadmis, švinas nėra pripažintas kaip MT induktorius ir švino detoksikacija sliekuose sudarant MT ir švino kompleksus nėra nustatyta (Jones et al., 2009).

1.3. Kadmio ir švino poveikio sliekų augimui, išgyvenamumui, reprodukcijai tyrimų apžvalga

Sliekai – geriausiai ištirti iš dirvožemyje gyvenančių gyvūnų grupių. Šiuo metu yra žinoma apie 400 rūšių *Lumbricidae* šeimos sliekų, iš jų Lietuvoje aptinkama tik 15 rūšių. Viena iš jų yra kompostiniai *Eisenia fetida* sliekai. Šie sliekai plačiai paplitę organikos prisotintuose, ne tik gamtiniuose, bet ir antropogeniniuose dirvožemiuose. Sliekų paplitimą gali lemti daugybė veiksnių: granulimetrinė dirvožemio sudėtis, pH, dirvožemio tipas, sunkiųjų metalų kiekis, organinių

medžiagų kiekis (Eijsackers, 2001). Pačiais svarbiausiais veiksniais laikoma drėgmė ir temperatūra. Vandens trūkumas padidina jautrumą aukštesnei temperatūrai (Moreau-Valancogne et al., 2013).

Visi sliekai, įskaitant *Eisenia fetida*, atlieka daugybę funkcijų, kurios gerina dirvožemio derlingumą: efektyviai didina maistinių medžiagų kiekį, formuoja humusą, skaido ir išmaišo organines medžiagas, gerina dirvožemio struktūrą, didina azoto kiekį, mažina anglies ir azoto santykį. Slieko padarytais urveliais lengviau į dirvožemį patenka papildomas oro ir vandens kiekis. Dėl tokių funkcijų susidaro palankesnės sąlygos augalų augimui, bei šaknų ilgėjimui (Kurian et al., 2011).

Į sliekus teršalai patenka keliais būdais: per kūno paviršių ir per virškinamąjį traktą, dėl to sliekai yra jautresni teršalų poveikiui ir yra dažnai naudojami dirvožemio toksiškumui vertinti.

Vieni dažniausiai naudojamų parametrų toksiškumui vertinti yra sliekų svoris ir mirtingumas. Šie parametrai lengvai ir greitai išmatuojami laboratorinėmis sąlygomis. Jau nuo seniai siekiama ištirti metalų poveikį sliekams, vienas iš tyrimų buvo D. J. Spurgeon et al. (1994), sliekai *Eisenia fetida* 8 savaites buvo veikiami skirtingomis kadmio 0, 5, 20, 80, 300 mg Cd/kg ir skirtingomis švino 100, 400, 2000, 10 000 mg Pb/kg koncentracijomis. Viso eksperimento metu net ir didžiausios kadmio koncentracijos nesukėlė žymaus mirtingumo. Veikiant švinu jau po savaitės poveikio laiko didžiausia 10 000 mg Pb/kg švino koncentracija sukėlė 100 % mirtingumą, kitos švino koncentracijos nedarė žymaus poveikio mirtingumui. Vertinant svorio pokyčius visos švino koncentracijos ir 5-80 mg Cd/kg kadmio koncentracijos pirmąją poveikio savaitę nesukėlė svorio mažėjimo, tačiau jau po 2 savaitių ekspozicijos buvo stebimas sliekų svorio mažėjimas. Didžiausia kadmio koncentracija 300 mg Cd/kg jau pirmąją savaitę sukėlė sliekų svorio sumažėjimą. Remiantis A. J. Morgan et al. (1999) tyrimu galima teigti, kad individams veikiamiems kadmiu ir švinu, buvo reikalingas didelis energijos kiekis išgyventi ir prisitaikyti, todėl daug mažiau energijos teko somatinių (augimo) ląstelių gamybai, dėl to sliekų svoris eksperimento metu mažėjo.

Skirtingo amžiaus organizmai skirtingai reaguoja į taršą, jaunikliai ir seni organizmai yra jautriausi. Tad svarbu ištirti ne tik suaugusius, bet ir jautresnio amžiaus grupes. Vienas tokių tyrimų J. Žaltauskaitės ir I. Sodienės (2014). Šiame tyrime *Eisenia fetida* sliekų jaunikliai 14 savaitių buvo veikiami skirtingomis kadmio 1, 2, 5, 10, 40, 100, 250, 500 mg Cd/kg ir švino 40, 250, 500, 1000, 2500 mg Pb/kg koncentracijomis, įvertinamas sliekų augimas ir mirtingumas. Vertinant mirtingumą nustatyta, kad 1–250 mg Cd/kg koncentracijos sukėlė mažą mirtingumą (10-23 proc.). Didžiausias mirtingumas veikiant didžiausia 500 mg Cd/kg kadmio koncentracija. Veikiant švinu toksiškiausios buvo ir didžiausią mirtingumą sukėlė 500–2500 mg Pb/kg švino koncentracijos. Įvertinus augimą nustatyta, kad tik didesnės kadmio koncentracijos sukėlė svorio mažėjimą lyginant su kontroline grupe. Didžiausias svorio sumažėjimas nustatytas veikiant didžiausiomis 250 ir 500

mg Cd/kg koncentracijomis. Nei viena švino koncentracija, nesukėlė svorio mažėjimo, tačiau viso eksperimento metu sliekų svoris buvo mažesnis lyginant su kontroline grupe.

W. Luo et al. (2014) tyrime buvo ištirti lauko mėginiai iš skirtingų tipų kraštovaizdžių: miškų, pievų ir šaudymų plotų. Skirtinguose dirvožemio mėginiuose nustatytos švino koncentracijos siekė 15, 36, 42, 45, 47, 50, 88, 355, 656, 2153, 2398 mg Pb/kg. Eksperimento metu buvo nustatytas *Eisenia adrei* sliekų mirtingumas ir svorio pokyčiai po poveikio šiomis koncentracijomis. Nustatyta, kad tik didžiausios švino koncentracijos (2153 ir 2398 mg Pb/kg) sukėlė sliekų mirtį, šie rezultatai buvo panašūs į tais pačiais metais vykdyto J. Žaltauskaitės ir I. Sodienės tyrimo rezultatus. Didžiausias svorio sumažėjimas taip pat buvo nustatytas po poveikio 2153 ir 2398 mg Pb/kg švino koncentracijomis. Kai kurių tyrimų duomenimis net ir mažiausia tarša sunkiaisiais metalais gali sukelti mirtingumą, nesukeliant sliekų svorio mažėjimo. Tokie rezultatai gauti D. J. Spurgeon et al. (2004) tyrime. *Lumbricus rubellus* sliekų jaunikliai buvo veikiami skirtingomis kadmio koncentracijomis (0, 12,5, 50, 200, 800 mg Cd/kg). Atlikti matavimai parodė, kad nei viena koncentracija nesukėlė sliekų svorio mažėjimo, tačiau įvertinus mirtingumą nustatyta, kad visos kadmio koncentracijos sukėlė sliekų žūtį, didžiausias mirtingumas buvo veikiant didžiausia 800 mg Cd/kg kadmio koncentracija. Eksperimento pabaigoje (po 300 dienų) didžiausioje koncentracijoje daugiau nei 80 % sliekų buvo mirę. Tačiau dar 1994 metais D. J. Spurgeon et al. (1994) tyrime buvo pabrėžta, kad mirtingumas nėra tinkamiausias parametras norint nustatyti sunkiųjų metalų toksiškumą.

Tik sukaupus tam tikrą sunkiųjų metalų kiekį pasireiškia individų svorio ir mirtingumo pokyčiai, todėl dažnai yra vykdomai teršalų bioakumuliacijos tyrimai skirtingos taršos dirvožemiuose. A. Heikens et al. (2001) tyrimo meto buvo lyginamas skirtingų organizmų gebėjimas kaupti metalus (Pb, Cd, Cu, Ni). Pasirinkti organizmai: sliekai, vorai, vabalai, šimtakojai, šešiakojai nariuotakojai, dviuodegiai. Kaupimas vyksta tokia tvarka: sliekai > vorai > dviuodegiai > šimtakojai > nariuotakojai > vabalai. Taigi, geriausiai metalus akumuliuoja sliekai.

Žinoma, skirtingos sliekų rūšys pasižymi skirtingu jautrumu. Vienoms rūšims ta pati teršalo koncentracija gali būti labiau biologiškai prieinama nei kitiems. X. Chen et al. (2017) tyrimo metu buvo vertinamas skirtingų sliekų rūšių (*Metaphire guillelmi* ir *Eisenia fetida*) jautrumas ir bioakumuliacija. Sliekai buvo veikiami skirtingomis kadmio koncentracijomis (0; 0,1; 0,5; 1; 5; 10; 50; 100 mg Cd/kg). Nustatyta, kad *Metaphire guillelmi* sliekų rūšis buvo jautresnė lyginat su *Eisenia fetida*, tačiau pastebėta, kad esant mažesnėms kadmio koncentracijoms bioakumuliacija yra intensyvesnė. Mažesnė *Eisenia Fetida* bioakumuliacija gali būti paaiškinama geresniu jų detoksikacijos mechanizmu.

Bioakumuliacija priklauso ne tik gyvūnų rūšies, bet ir nuo pačio teršalo. Lyginant skirtingų metalų (Pb, Cd, Cu, Ni) kaupimąsi, pastebėta, jog didėjant koncentracijai dirvožemiuose

nariuotakojuose ir Lumbricidae sliekuose geriausiai kaupiasi švinas. Kitų metalų Cd ir Cu koncentracijos organizmuose didėjo nežymiai, Zn koncentracijos didėjimas šiame tyrime nenustatytas (Heikens et al., 2001). L. Li et al. (2010) tyrime *Eisenia fetida* sliekai buvo veikiami skirtingomis kadmio 0,68; 1,64; 1,91; 2,49 mg Cd/kg ir skirtingomis švino 8,23; 15,56; 22,89; 24,37 mg Pb/kg koncentracijomis, šios koncentracijos buvo nustatytos paėmus kiaulių mėšlo mėginius iš skirtingų vietų. Tyrimo rezultatai skyrėsi nuo A. Heikens et al. (2001), kadmio bioakumuliacijos faktorius buvo didesnis lyginant su švino. F. Liu et al. (2012) tyrime, taip pat buvo nustatyta didesnė kadmio bioakumuliacija sliekuose. Be to, buvo minima sliekų geba mažinti sunkiųjų metalų kiekį dirvožemyje. Tyrimo duomenimis prieš įdedant sliekus į dirvožemį kadmio koncentracija jame siekė 2.57 ± 0.07 mg Cd/kg, švino koncentracija 116 ± 8.47 mg Pb/kg, po įdėjimo koncentracija sumažėjo iki 0.68 ± 0.051 mg Cd/kg ir 45 ± 2.73 mg Pb/kg. Sliekų bioakumuliacija atitinkamai siekė 7.64 ± 0.35 mg Cd/kg ir 51.33 ± 1.97 mg Pb/kg. Kartais tam tikras sliekų gebėjimas akumuliuoti metalus turi įtakos ne tik jiems patiems ar dirvožemio kokybei, bet ir jais besimaitinantiems gyvūnams: vabzdžiams, varliagyviams, ropliams, žuvims, paukščiams ir žinduoliams (Maleri et al., 2008).

A. Lemtiri et al. (2016) tyrime minimi, kad sliekų reprodukcija, kokonai ir jų svoris yra jautresni parametrai sunkiųjų metalų poveikiui, lyginant su pačių sliekų svoriu ir mirtingumu. *Eisenia fetida* sliekai reprodukuoja kokonus kas 3 dienos, maži sliekučiai iš kokonų išsiriti po 23 dienų. Iš kai kurių kokonų sliekai gali ir neišsiriti (Jones et al., 2009; Fadaee, 2012).

Anksčiau minėtame tyrime D. J. Spurgeon et al. (1994) veikiant skirtingomis kadmio ir švino koncentracijomis (0, 5, 20, 80, 300 mg Cd/kg ir 100, 400, 2000, 10 000 mg Pb/kg) buvo vertinamas *Eisenia fetida* sliekų reprodukcija. Abiejų metalų didžiausios koncentracijos neigiamai paveikė kokonų gamybą (kokonų rasta nebuvo), kitos koncentracijos nesukėlė aiškios kitimo tendencijos. 2004 metų D. J. Spurgeon et al. (2004) tyrime *Lumbricus rubellus* sliekai buvo veikiami 0, 12,5, 50, 200, 800 mg Cd/kg koncentracijomis. Eksperimento metu nustatyta, kad sliekų kokonų produkcija mažėja didėjant kadmio koncentracijai, o veikiant didžiausia koncentracija kokonų iš viso nėra. Panašūs rezultatai gauti J. Žaltauskaitės ir I. Sodienės (2014) tyrime. Kokonų skaičius tendencingai mažėjo veikiant vis didesnėmis kadmio koncentracijomis (0, 1, 2, 5, 10 mg Cd/kg), paveikti didesnėmis nei 40 mg Cd/kg koncentracijomis sliekai buvo nereproduktyvūs. Šiame tyrime buvo tiriamas ir švino poveikis reprodukcijai. Nustatyta, kad vienintelė 40 mg Pb/kg koncentracija buvo tinkama kokonų gamybai, tačiau joje reprodukcijai vyko 2 kartus lėčiau. Kitose švino koncentracijose (250, 500, 1000, 2500 mg Pb/kg) kokonų rasta nebuvo. Tad galima teigti, kad būdami didelėmis metalų koncentracijomis užterštame dirvožemyje sliekai savo energiją sutelkia teršalo detoksikacijai ir jos nebeužtenka dauginimuisi ir kokonų gamybai.

1.4. Oksidacinio streso sukelti biocheminiai pokyčiai

Pagal 1956 m. D. Harmanas hipotezę aktyviosios deguonies formos, sutrumpintai ROS, kaip šalutiniai produktai susidaro redukcijos ir oksidacijos procesų metu, kai organizmas patiria oksidacinį stresą. ROS laikomi įvairūs deguonies radikalai ir kitos aktyviosios deguonies junginių formos. S. Espin et al. (2014) ROS apibūdina kaip nestabilias reaktyvias molekules, kurios veikia kaip signalinės molekulės su reguliavimo funkcijomis ir yra svarbios antioksidacinių sistemų procesuose (Schmitt et al., 2014).

Literatūroje minimi veiksniai, kurie gali skatinti ROS susidarymo greitį, tai sausra, radiacija, temperatūra, ultragarsas, infekcijos, tam tikrų medžiagų (dažniausiai teršalų) patekimas į organizmą ir kt. Susidariusios aktyviosios deguonies formos neigiamai veikia organizmus molekuliniame lygmenyje (pažeidžia baltymus, lipidus, DNR), sukelia biocheminius pokyčius organizme susijusius su lipidų peroksidacijos padidėjimu, kol galiausiai neigiamai paveikia ir pačių ląstelių veiklą (Chong et al., 2014; Saint-Denis et al., 2001).

Susidarius ROS organizmo viduje suveikia antioksidaciniai mechanizmai, kurių pagalba aktyviosios deguonies formos yra pašalinamos. Antioksidaciniai mechanizmai apima tiek fermentinius tiek nefermentinius antioksidantus (Lepetsos et al., 2016). Pagal P. Lepetsos et al. (2016) oksidacinis stresas pasireiškia sutrikus balansui tarp ROS gamybos ir antioksidacinės gynybos procesų.

Biocheminiams pokyčiams diagnozuoti naudojami oksidacinio streso biožymenys. Jų pagalba galima įvardyti galimus fiziologinio ar patologinio proceso redokso komponentus ir įvertinti toksinės medžiagos poveikio stiprumą ir progresavimą (Margaritelis et al., 2016). Pagal M. Velki et al., (2012) biologiniai žymenys suteikia daugiau informacijos nei įprasti toksiškumo bandymai, jie lyg išankstinio perspėjimo signalai gali aptikti teršalų sukeltus pakeitimus prieš įvykstant pokyčiams aukštesniuose biologinės organizacijos lygmenyse. Literatūroje minima, kad biologinių žymenų pagalba ne tik prognozuojami teršalų poveikiai, bet ir nustatoma reprodukcinių funkcijų aktyvumas, fermentinis aktyvumas, lizosominių membranų stabilumas, ląstelių apoptozė ir DNR pažeidimai (Schmitta et al., 2014).

Superoksido dismutazė (SOD), katalazė (CAT), glutationo S transferazė (GST) glutationo reduktazė (GR) - tai dažniausiai tiriami fermentai, jie yra puikūs biocheminių pokyčių indikatoriai. Šie fermentai laikomi aplinkos poveikio biožymenimis ir yra svarbūs neutralizuojant ir/ar detoksikuojant oksidacinę žalą (Javed et al., 2016). Dar vienas biožymuo dažnai naudojamas tyrimuose MDA – ląstelės malondialdehido lipidų peroksidacijos laipsnio rodiklis (Wu et al., 2010).

Superoksido dismutazė (SOD) laikoma pirmąja antioksidacinės apsaugos pakopa. Šis fermentas yra atsakingas už O_2 transformaciją į H_2O_2 , vėliau peroksisomose esanti katalazė (CAT)

suskaido H_2O_2 į deguonies ir vandens molekules (Wu et al., 2010). Dėl šių dviejų fermentų veiklos superoksido anijonų ir vandenilio peroksido kiekis mažėja ir taip neutralizuojamas neigiamas poveikis ląstelėms.

Glutathiono S transferazė (GST) yra II metabolizmo etapo fermentas, gali palengvinti konjugaciją ir skatinti toksinių medžiagų detoksikaciją. Ankstesnių tyrimų duomenimis sunkieji metalai tokie kaip Cd ir Cu skatina GST atsaką sliekuose (Ribera et al., 2001 and Saint-Denis et al., 1999). Glutathiono konjugacija yra viena pagrindinių sąlygų ksenobiotikų detoksikacijai, palaikant homeostazę (Vlahović et al., 2016).

Glutathiono reduktazė (GR) – svarbus antioksidacinis fermentas, kuris dalyvauja ROS ir metalų surišimo procese. Redukuota glutathiono forma (GSH) virsta oksiduota forma (GSSG), kuri turi būti vėl redukuota, kad šis tripeptidas galėtų toliau funkcionuoti. Reikšmingas oksidacinio streso rodiklis yra GSH/GSSG santykis, kurio sumažėjimas rodo bendro redukcinio pajėgumo susilpnėjimą organizme. Šio rodiklio reikšmės mažėjimą gali lemti padidėjęs aktyviųjų deguonies formų kiekis, padidėjęs glutathiono peroksidazės ar S-transferazės bei sumažėjęs glutathiono reduktazės aktyvumas (Didžiapetrienė ir kt., 2004).

Malondialdehidai (MDA) – lipidų peroksidacijos rodiklis, kuris parodo oksidacinius lipidų pažeidimus. Peroksidacijai būdingos grandininės reakcijos (pradžia-sklidimas-baigtis) (Kohen et al., 2002). Reakcijos baigtis yra lipidų skilimas, šio proceso metu atsiranda pirminiai membranos pažeidimai. Jeigu vandenyje atsiranda tirpių peroksidacijos produktų jie patenka į kitas ląsteles taip atsiranda antrinės pažaidos (Jones, 2008). Sukeliama baltymų agregacija, slopinamos fermentų funkcijos, atsiranda DNR pakitimai, kurie lemia mutacijas, sutrinka antioksidacinė ląstelės sistema (Meral et al., 2000).

Literatūroje aprašoma daug tyrimų, kuriuose toksinių medžiagų poveikiui sliekams nustatyti naudojami biožymenys. S. Maity et al. (2007) tyrė pavienio švino poveikį sliekams *Lampito mauritii*. Sliekai buvo veikiami 0, 75, 150 ir 300 mg kg^{-1} švino koncentracijomis. Matavimai atliekami po 2, 7, 14, 21, 28 dienų. Atlikus biocheminius tyrimus nustatytos biožymenų GSH, GSSG, GST koncentracijos. Po 2 ir 7 dienų GSH koncentracija buvo žymiai mažesnė lyginant su kontroline grupe, o po 14 ir 21 dienos veikiant vis didesne švino koncentracija GSH koncentracija buvo didesnė lyginant su kontroline grupe. Tačiau bandymo pabaigoje, po 28 dienų, GSH koncentracija vėl tapo artima kontrolinės grupės GSH koncentracijai. Vertinant GSSG koncentraciją po 2, 7, 14, ir 21 dienos pastebėtas jos padidėjimas lyginant su kontroline grupe, o tai autorių teigimu signalizuoja apie organizmo patiriamą oksidacinį stresą. Kaip ir minėta anksčiau GSH koncentracija yra susijusi su GSSG koncentracija, o šių koncentracijų santykis (GSH/GSSG) yra reikšmingas oksidacinio streso rodiklis. S. Maity et al. (2007) tyrime pastebėta, kad po 7 dienų (GSH/GSSG) santykis mažėjo didinant švino koncentraciją, tai reiškia, kad pastebėtas redukcinio

pajėgumo mažėjimas organizme veikiant vis didesnėmis švino koncentracijomis. Vertinant GST koncentracijas tik po 2 ir 7 dienų pastebėtas reikšmingas poveikis. GST koncentracijos didėjo veikiant vis didesnėmis švino koncentracijomis, vadinasi buvo pastebėtas vis stipresnis organizmo atsakas į teršalus. Autorių nuomone, skirtingos švino koncentracijos daro reikšmingą poveikį GSH, GSSG IR GST koncentracijoms, o šios koncentracijos gali būti naudojamos kaip biožymenys informuojantys apie stresą, kurį patiria organizmai.

Pagal M. Saint-Denis et al. (2001) ir Espin et al. (2014), švinas plačiai paplitęs sunkusis metalas, kuris slopina fermentų veiklą, neigiamai veikia antioksidacines ląsteles, biologines membranas bei sukelia oksidacinį stresą. M. Saint-Denis et al., (2001) tyrime *Eisenia fetida andrei* sliekai buvo veikiami skirtingomis pavienio švino 0, 30, 60, 120 ir 120 mg kg⁻¹ koncentracijomis. Po 2, 7, 14, 28 dienų buvo vertinami biožymenys: GST, MDA, CAT, GSH, GSSG kurie parodė, jog *Eisenia fetida andrei* sliekai patiria stresą. Nustatyta, kad biocheminis atsakas priklausė nuo švino koncentracijos ir poveikio laiko. Ryškių pokyčių susijusių su GST nenustatyta, o CAT ir MDA rodikliai kito veikiant skirtingomis švino koncentracijomis. CAT veikla po 2, 14, 28 dienų sumažėjo, o MDA padidėjo. Didėjantis GSH/GSSG santykis informuoja apie *Eisenia fetida andrei* patiriamą oksidacinį stresą.

W. Zhang et al. (2015) tyrime buvo vertinamas pavienis švino ir kompleksinis švino ir BDE209 poveikis *Eisenia fetida* sliekų biocheminiams rodikliams (SOD, CAT, GST, MDA ir kt.). Sliekai eksperimento metu veikiami: 0 µg of Pb g⁻¹ + 0 µg BDE209 g⁻¹; 250 µg Pb g⁻¹ + 0 µg BDE209 g⁻¹; 250 mg Pb µg⁻¹ + 100 µg BDE209 g⁻¹ koncentracijomis. Pavienis švino poveikis sukėlė matuojamų rodiklių, SOD, CAT, GST fermentų suaktyvėjimą. Fermentų kiekis, paveikus pavienio švino 250 µg Pb g⁻¹ koncentracija, buvo didesnis lyginant su kontroline grupe ir su kompleksiniu Pb+BDE209 poveikiu. Toks antioksidacinės gynybos sistemos suaktyvėjimas apsaugo organizmą nuo oksidacinio poveikio. W. Zhan et al. (2015) tyrime pastebėta, MDA kiekis neigiamai koreliuoja su fermentų veikla. Tai reiškia, kad padidėjus MDA, fermentų veikla tampa mažiau aktyvi, ir atvirkščiai, suaktyvėjus fermentams MDA sumažėja. Veikiant pavienio švino 250 µg Pb g⁻¹ koncentracija nustatytas MDA rodiklis buvo mažesnis lyginant su kontroline grupe ir mažesnis lyginant su kompleksiniu švino ir BDE209 poveikiu.

Kaip ir daugelis mokslininkų Z. Jiang et al. (2006) kadmį vadina vienu toksiškiausių metalų sliekams, kurio toksiškumas gali priklausyti net tik nuo dozės, bet ir nuo poveikio laiko. X. Yang et al. (2012) tyrime 8 savaites buvo tiriamas *Eisenia fetida* sliekų fermentinių biologinių žymenų (GST, CAT, SOD) atsakas, veikiant mažomis pavienio kadmio (2,5 mg/kg) ir pireno (0,96 mg/kg) koncentracijomis, bei šių medžiagų mišiniu (2,5 mg Pb/kg+0,96 mg pireno/kg). Eksperimento meto nustatyta, kad sumažėjus GST aktyvumui padidėja SOD IR CAT aktyvumas. Vertinant pavienį kadmio poveikį GST atsakui, pastebėta kad GST reikšmingai padidėjo tik po 6

savaičių, buvo 33,93 proc. didesnis, lyginant su kontroline grupe. Pavienis pireno poveikis pasireiškė daug anksčiau nei pavienis kadmio poveikis (po 2 ir 3 savaičių). Mišinio poveikis buvo artimas pavieniui kadmio poveikiui. Veikiant tik kadmiu SOD aktyvumas pirmąją ir ketvirtąją savaitę buvo nežymus, tačiau žymiai padidėjo šeštą ir aštuntą savaitėmis, lyginant su kontroline grupe. Priešingas rezultatas buvo gautas veikiant pavieniu pireno poveikiu, SOD aktyvumas pirmomis savaitėmis buvo žymiai didesnis nei bandymo pabaigoje. Veikiant mišiniu SOD aktyvumo padidėjimas pastebėtas tik pirmąją savaitę. CAT aktyvumas veikiant pavienio kadmio poveikį buvo labai panašus į SOD aktyvumą. CAT aktyvumas veikiant mišiniu buvo beveik toks pat kaip ir veikiant pavienio kadmio koncentracija, dėl to autoriai daro išvadą kad kadmio skatina pireno toksiškumą. Šio eksperimento metu nustatyta, kad *Eisenia fetida* antioksidacinė fermentų sistema, paveikus maža kadmio koncentracija suaktyvėja tik po ilgesnio laikotarpio.

O. Panzarino et al. (2015) tyrime naudotos žymiai didesnės kadmio koncentracijos nei Yang et al. (2012) tyrime, tačiau eksperimentas vyko trumpiau. Sliekai *Eisenia anderei* 14 dienų buvo veikiami 0, 10, 100 $\mu\text{g g}^{-1}$ kadmio koncentracijomis. Vertinamas biocheminis sliekų atsakas (GST, CAT, MDA). Veikiant skirtingomis kadmio koncentracijomis nepastebėtas joks reikšmingas poveikis GST aktyvumui. Tyrimo metu didžiausia 100 $\mu\text{g g}^{-1}$ kadmio koncentracija slopina CAT veiklą, o mažesnė 10 $\mu\text{g g}^{-1}$ kadmio koncentracija skatina. Autorių teigimu, sliekų organizmo antioksidacinei sistemai sunku kompensuoti aukštą oksidacinį stresą, todėl CAT atsakas ima silpnėti. Atlikus MDA koncentracijos tyrimą nustatyta, kad didėjant koncentracijai MDA didėja, o tai reiškia jog lipidų oksidacinių pažeidimų skaičius taip pat didėja.

1.5. Sliekų gebėjimas atsistatyti po poveikio teršalais

Literatūroje itin dažnai aprašoma dirvožemio geba atgauti savo funkcijas po įvairių sutrikdymų, tačiau kiek mažiau tyrimų yra atlikta tiriant dirvožemio organizmų gebą atsistatyti (atgauti buvusias funkcijas). Kai kurie autoriai atsistatymą apibūdina kaip toksikodinaminį atsikūrimą, kurio metu vyksta fiziologiniai kompensaciniai procesai, bei atkuriamas organizmo atsakas į patiriamą stresą (Ashauer et al., 2015).

M. Kattwinkel et al. (2012) mokslinėje ataskaitoje ekologinis atsistatymas aprašomas, kaip didelio skirtumo nuo kontrolės nebuvimas arba greitas populiacijos ar bendruomenės rodiklių grįžimas į ankstesnę būklę. Organizmų funkcijų savireguliacija ir stabilizavimas pasireiškia perkėlus organizmus iš užterštos aplinkos į švarią. Tačiau ne visi organizmai turi vienodą tolerancijos ribą, vieniems tam tikra teršalo koncentracija gali būti mirtina, o kiti organizmai nutraukus poveikį dar gali atsistatyti ir išgyventi. Dažniausiai dirvožemio organizmų apsauginė sistema neutralizuoja trumpalaikius poveikius, taip pat organizmas lengviau atsistato paveikus jį mažomis koncentracijomis, nei didelėmis ir ilgą laiką. Skirtingos organizmo funkcijos turi skirtingą

gebą atsistatyti, vienos atsistato lengviau, kitos sunkiau. Yra tiriami įvairių sistemų atsistatymai: fiziologiniai morfologiniai, elgesio, biocheminiai (biožymenų), reprodukcijos ir pan.

M. Velki et al. (2012) tyrime buvo nustatinėjimas *Eisenia andrei* sliekų biocheminių rodiklių (AChE, CES, CAT) atsistatymas po poveikio fosforo organiniu insekticidu – dimetoatu. 28 dienas sliekai buvo veikiami 0,03; 0,3 ir 3 mg/kg dimetoato koncentracijomis ir 28 dienas stebimas atsistatymas. Po 7 dienų poveikio dimetato koncentracijomis nustatytas AChE ir CES aktyvumo slopinimas, o po 7 dienų atsistatymo laikotarpio AChE ir CES veikla reikšmingai padidėjo. Tačiau visą atsistatymo laikotarpį visose insekticido koncentracijose AChE ir CES veiklos aktyvumas buvo daug mažesnis nei kontrolinės grupės. Didžiausias AChE ir CES veiklos slopinimas nustatytas paveikus didžiausia 3 mg/kg konc., tačiau atsistatymas šioje koncentracijoje buvo aktyvesnis nei kitose. Lyginant AChE ir CES slopinimą, nustatyta, kad AChE yra jautresnis teršalų poveikiui nei CES. CAT aktyvumo pokyčiai buvo mažesni, tačiau po 7 dienų ekspozicijos 0,03; 0,3; 3 mg/kg koncentracijomis CAT aktyvumas sumažėjo, lyginant su kontroline grupe. Po 7 dienų atsistatymo periodo nustatytas CAT veiklos aktyvumo padidėjimas, tačiau viso atsistatymo laikotarpiu CAT veikla negrįžo į pradinę būseną. Tyrimo metu pastebėta, kad nei vienas iš matuotų rodiklių po poveikio didžiausia koncentracija negrįžo į pradinį aktyvumą. Mažesnės dimetato koncentracijos (0,03 ir 0,3 mg/kg) nepaveikė atsistatymo mechanizmų, taip pat pastebėta, kad ilgėjant poveikio laikui fermentų veiklos atsistatymas didėjo.

M. Rault et al. (2008) tyrime buvo nustatinėjamas ne tik biocheminis sliekų atsistatymas, bet ir fiziologinis (svorio augimas). *A. chlorotica* ir *A. caliginosa* sliekai 14 dienų buvo veikiami 1 ir 10 mg/kg insekticido etil-parationo koncentracija, o po 14 dienų sliekai buvo perkelti į švarų dirvožemį. Veikiant skirtingomis insekticido koncentracijomis stebimas poveikis sliekų svoriui, o po perkėlimo į švarų dirvožemį sliekų svorio atsistatymo geba. Paveikus vienodomis koncentracijomis dvi skirtingas sliekų rūšis sulauktas skirtingas atsakas. *A. chlorotica* sliekų svoris paveikus 1 ir 10 mg kg⁻¹ etil-parationo koncentracija ėmė mažėti tik po 8 dienų, *A. caliginosa* sliekų svoris paveikus 1 mg kg⁻¹ konc. ėmė mažėti anksčiau (po 6 dienų), paveikus didžiausia 10 mg kg⁻¹ koncentracija sliekų svoris mažėjo nuo pirmų poveikio dienų. Atsistatymo mechanizmai abiejų rūšių panašūs. Nors sliekai buvo laikomi švariame dirvožemyje, tačiau sliekai po poveikio insekticidu negebėjo atsistatyti ir jų svoris mažėjo.

B. A. Smith et al. (2010) taip pat tyrė sliekų (*Eisenia andrei*) svorio atsistatymą po poveikio teršalais. *Eisenia andrei* 21 dieną buvo veikiami pavienio kadmio 5 mg/kg ir pavienio cinko 100 mg/kg koncentracija, o po 21 dienos buvo stebimas sliekų svorio atsistatymas. Po poveikio kadmio sliekų svoris siekė 0.086 ± 0.016 g, o po 21 dienos atsistatymo laikotarpio padidėjo iki 0.113 ± 0.006 g. Paveikus cinku sliekų masė buvo 0.076 ± 0.024 g, po 21 dienos atsistatymo laikotarpio sliekų svoris išliko toks pati. Tai parodo, kad paveikus cinku sliekų

organizmo apsaugos mechanizmai nesuaktyvėjo ir į jį nebuvo reaguojama kaip į teršalą, o kadmio nors ir mažesnėmis nei cinko koncentracijomis sukėlė slienkų svorio pokyčius.

C.A.M. van Gestel et al. (1993) tyrime aprašoma, kad skirtingos sistemos skirtingai reaguoja į tą patį teršalo kiekį ir jų atsistatymo geba yra taip pat nevienoda. Eksperimento metu slienkai *Eisenia andrei* 21 dieną buvo veikiami 0, 10, 18, 32, 56, 100 mg Cd/kg koncentracijomis, buvo nustatinėjamas metalo poveikis augimui, reprodukcijai ir akumuliacijai. Po to slienkai buvo perkelti į švarų dirvožemį ir po 21 dienos stebimas tų pačių rodiklių atsistatymas. Nustatyta, kad slienkų svorio augimas po poveikio 10, 18 ir 32 mg Cd/kg koncentracijom ir atsistatymo laikotarpiu buvo didesnis nei kontrolinės grupės, tačiau slienkai, kurie buvo paveikti didesnėmis koncentracijomis (56 ir 100 mg/kg) atsistatymo laikotarpiu turėjo mažesnę svorį. Taigi didesnės koncentracijos yra toksiškesnės ir net po perkėlimo gali ir toliau neigiamai veikti individus, slienkai sunkiai geba atsistatyti, o jų augimo sistema yra itin jautri.

Tame pačiame darbe įvertinus reprodukciją nustatyta, kad tik mažiausia 10 mg Cd/kg koncentracija gali sutrikdyti reprodukcinių funkcijų atsistatymą, o po poveikio kitomis koncentracijomis slienkai *Eisenia andrei* puikiai geba reprodukuoti. Taigi kadmio nesukėlė neigiamo efekto reprodukcijos atsistatymo mechanizmams. Taip pat, pastebėta, kad kadmio yra lengvai akumuliuojamas ir lengvai pašalinamas iš slienkų organizmo. Veikiant vis didesnėmis koncentracijomis, proporcingai didėjo ir vidinė kadmio koncentracija, tačiau per atsistatymo laikotarpį ji sumažėjo perpus (Gestel et al., 1993).

Visuose minėtuose tyrimuose pabrėžiama, kad atsistatymas priklauso ne tik nuo poveikio laiko, veikiančios medžiagos koncentracijos, bet ir nuo testuojamo organizmo rūšies, individualių savybių ir pačios organizmo sistemos rūšies, kuri yra paveikta.

Galima teigti, kad tyrimų susijusių su sunkiųjų metalų (kadmio ir švino) poveikiu dirvožemio organizmų fiziologiniams ir biocheminiams rodikliams rasti nesunku, tačiau atsistatymo po ilgalaikio poveikio tyrimų mažai arba išvis nėra. Taigi, slienkų *Eisenia fetida* atsakas ir atsistatymas po poveikio kadmio ir švinu yra svarbi tyrimų kryptis.

2. METODIKA

Eksperimentas atliekamas siekiant nustatyti kadmio ir švino poveikį kompostinio sliekio *Eisenia fetida* augimui, išgyvenamumui, reprodukcijai, bioakumuliacijai ir biocheminiams rodikliams (SOD, CAT), išanalizuoti sliekų gebą atsistatyti po patirto streso. Visi tyrimai atlikti pagal OECD 222 protokolą (Ekonominio bendradarbiavimo ir plėtros organizacija, 2004). Tiriant kadmio ir švino poveikį sliekams eksperimentas vyko 56 dienas, atsistatymas taip pat buvo stebimas 56 dienas, Vytauto Didžiojo Universitete, Gamtos mokslų fakultete, Aplinkotyros katedros laboratorijoje.

2.1. Tyrimo metodika

Dirvožemis ruošiamas iš 70 % kvarcinio smėlio, 20 % kaolino molio ir 10 % samaninių durpių. Dirvožemis sumaišomas ir paskirstomas į plastikinius šviesius indelius po 700 gramų.

Švino ir kadmio koncentracijos pasirenkamos pagal J. Žaltauskaitės ir I. Sodienės (2014) tyrimą. Naudojame CdCl_2 ir $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ medžiagas. Metalų poveikio tyrimui naudotos kadmio koncentracijos (5, 10, 100, 250, 500 mg/kg) ir švino koncentracijos (40, 250, 500, 1000, 2500 mg/kg). Kiekvienos koncentracijos tyrimas vykdytas turint po 3 pakartojimus, kontrolės taip pat 3 pakartojimai.

Po paros laiko kai cheminės medžiagos pasiskirsto dirvožemyje įvedami testuojami organizmai - kompostiniai *Eisenia fetida* sliekai. Atrenkami kuo vienodesnio amžiaus ir dydžio sliekai. Į kiekvieną indelį įleidžiama po 15 suaugusių sliekų prieš tai juos nuplaunant, nusausinant ir pasveriant. Kiekvienas sliekas dedamas ant dirvožemio paviršiaus ir palaukiama kol įsiraus į dirvožemį. Į kiekvieną indelį, vieną kartą per savaitę dedama po 5 g maltų avižų, sumaišytų su 5 ml vandens. Pašaras gerai įmaišomas į dirvožemį tam, kad nesiformuotų pelėsis. Indeliai laikomi pastovioje 20 ± 2 °C temperatūroje esant nuolatiniam 800 liuksų apšvietimui.

Vertinant metalų poveikį augimui ir išgyvenamumui stebėjimai ir matavimai atliekami 56 dienas. Sliekų augimas ir mirtingumas matuojamas kas 14 dienų. Po 56 dienų poveikio metalais iš kiekvienos dėžutės išimama po vieną testuojamą organizmą biocheminių rodiklių (SOD, CAT) analizei ir bioakumuliacijos tyrimui. Prieš atliekant biocheminių rodiklių ir bioakumuliacijos analizę išvalomas sliekų virškinamasis traktas, paliekant juos dviems paroms sudrėkintose petri lėkštelėse.

Po 56 dienų ekspozicijos sunkiaisiais metalais likę gyvi sliekai pasveriami ir perkeliama į švarų (metalais neužterštą), tokios pat masės kaip pradinis dirvožemį, suskaičiuojamas kokonų ir jauniklių skaičius tenkantis vienam sliekui. Kokonai ir jaunikliai taip pat perkeliama į švarų

dirvožemį. Atsistatymas vykdomas 56 dienas, augimo ir mirtingumo matavimai atliekami kas 14 dienų. Po 56 dienų atsistatymo iš kiekvienos dėžutės išimama po vieną slieką biocheminių rodiklių ir bioakumuliacijos analizei. Prieš atliekant biocheminių rodiklių ir bioakumuliacijos analizę išvalomas sliekų virškinamasis traktas, paliekant juos dviems paroms sudrėkintose petri lėkštelėse. Eksperimento pabaigoje suskaičiuojamas jauniklių ir kokonų skaičius tenkantis vienam sliekui.

Bendras baltymų kiekis nustatomas baltymų ekstraktą maišant su baltymus skaidančiu reagentu Bradford. Reagentas atskiedžiamas vandeniu santykiu 1:5. Baltymų ekstraktas gaunamas po dviejų centrifugavimų: iš pradžių 0,05-1 g užšaldyto kompostinio slieko *Eisenia fetida* audinio yra homogenizuojamas naudojant buferį (pH 7.8), kuriame yra 250 mmol L⁻¹ sacharozės, 1 mmol L⁻¹ EDTA. Homogenatai centrifuguojami 600 aps/min, 5 min, 4°C. Po centrifugavimo centrifugatas nupilamas ir jis vėl centrifuguojamas 13 000 aps/min, 30 min, 4°C.

Į kiuvetę pilama 1 ml skiesto reagento, 20 µl mėginio (po dviejų centrifugavimų). Atliekamas skiedimas: skiedimui naudojame 0,5 ml vandens ir 0,5 ml paruošto tirpalo. Absorbciją matuojame prie 595 nm bangos.

Superoksido dismutazė (SOD) – aktyvumo nustatymas buvo pagrįstas nitro tetrozolio (NBT) reakcija su superoksido dismutaze. Reakcijos metu turi susidaryti mėlynos spalvos junginys (formazano mėlis), kuo junginio mažiau susidaro tuo SOD aktyvumas mažesnis. Vieno SOD vieneto aktyvumas apibrėžiamas kaip fermento kiekis, kuris slopina 50 % NBT oksidacijos proceso.

Naudojamas mėginys po trijų centrifugavimų: iš pradžių 0,05-1 g užšaldyto kompostinio slieko *Eisenia fetida* audinio yra homogenizuojama naudojant buferį (pH 7.8), kuriame yra 250 mmol L⁻¹ sacharozės, 1 mmol L⁻¹ EDTA. Homogenatai centrifuguojami 600 aps/min, 5 min, 4°C. Po centrifugavimo centrifugatas nupilamas ir jis vėl centrifuguojamas 13 000 aps/min, 30 min, 4°C, tuomet vėl nupilamas centrifugatas ir centrifuguojamas 30 000 aps/min 105 min. Tokiu būdu paruošiamas baltymų ekstraktas SOD tyrimui.

Į kiekvieną mėgintuvėlį dedama: 1,15 ml kalio fosfato buferio (0,1 M, pH 7,8), 125 µl riboflavino (15,6 µM), 125 µl metionino (0,15 M), 125 µl NBT (756 µM), 50 µl baltymų ekstrakto (tuščiam mėginiui – kalio fosfato buferio). Vieni mėgintuvėliai laikomi neapšviesti, o kiti padedami po 15 W fluorescensine lempa. Apšviestų mėginių absorbcija matuojama esant 560 nm bangos ilgiui. Nunulinimui naudojame mėginius be baltymų ekstrakto, kurie buvo laikyti tamsoje. Formazano mėlio formavimosi slopinimas apskaičiuojamas:

$$\text{Slop \%} = 100 - (\text{Abs} \cdot 100 / \text{Abs}'); \quad (1.1.)$$

Abs – mėginio absorbcija; Abs' – tuščio mėginio absorbcija.

SOD aktyvumas išreiškiamas tarptautiniais vienetais (IU).

$$\text{IUSOD} = \text{Slop \%} / (50 \cdot \text{TP} \cdot \text{V}); \quad (1.2.)$$

Slop % - formazano mėlio slopinimo vidurkis, %; TP – bendras baltymų kiekis, mg/ml ekstrakto; V – ekstrakto tūris, ml.

Katalazės aktyvumas nustatomas remiantis katalazės reakcija su H₂O₂. H₂O₂ koncentracijos mažėjimas vertinamas spektrofotometriškai, 240 nm bangos ilgyje. Naudojamas baltymų ekstraktas po 3 centrifugavimų, kaip ir SOD.

Į kvarcinę kiuvetę pilama 1,275 ml kalio fosfatinio buferio (50 mM) ir 100 µl baltymų ekstrakto nunuliname ir tuomet staigiu judesiu įlašinama 125 µl H₂O₂ (37,5 mM). Katalazės aktyvumas išreiškiamas H₂O₂ skaidymo greičiu per minutę 1 mg baltymų.

$$\text{Aktyvumas} = (b \cdot V) / ({}^{\epsilon}\text{H}_2\text{O}_2 \cdot V' \cdot \text{TP}) \quad (1.3.)$$

b-tiesės koeficientas; V-mišinio tūris kiuvetėje, ml; ${}^{\epsilon}\text{H}_2\text{O}_2$ -H₂O₂ ekstinkcijos koeficientas, 43,6;

V'-ekstrakto tūris kiuvetėje, ml; TP-bendras baltymų kiekis, mg/ml ekstrakto.

Siekant nustatyti kompostiniuose sliekuose (*Eisenia fetida*) sukaupto kadmio (po poveikio 5 mg Cd/kg, 250 mg Cd/kg) ir švino (po poveikio 40 mg Pb/kg, 1000 mg Pb/kg) koncentraciją audiniuose buvo paimti analitiniai mėginiai iki 0,1 g sausos audinio masės. Mineralizuoti 1,5 h 3 ml 2M HNO₃ ir 1 ml H₂O₂ tirpale 150°C temperatūroje elektroterminiame mineralizatoriuje (High Performance Microwave Digestion System). Koncentracijos nustatytos atominės absorbcinės spektroskopijos metodu (AAS).

2.2. Statistinė duomenų analizė

Statistinė duomenų analizė atlikta naudojant STATISTICA programą. Vertinami sliekų augimo, išgyvenamumo, reprodukcijos, bioakumuliacijos, biocheminiai rodikliai ir jų atsistatymas veikiant skirtingomis švino ir kadmio koncentracijomis. Skirtumai tarp vidurkių palyginami taikant t-testą, skirtumai laikyti patikimais kai $p < 0,05$. Ryšiui tarp dviejų kintamųjų įvertinti naudota koreliacinė duomenų analizė, regresinė analizė. Apskaičiuojama švino ir kadmio letali koncentracija, sukelianti 50 % individų žūtį ir efektyvioji koncentracija, sukelianti matuojamo rodiklio sumažėjimą 50 %, lyginant su kontrole, efektyvi koncentracija, sukelianti 40 % reprodukcijos slopinimą, lyginant su kontroline grupe.

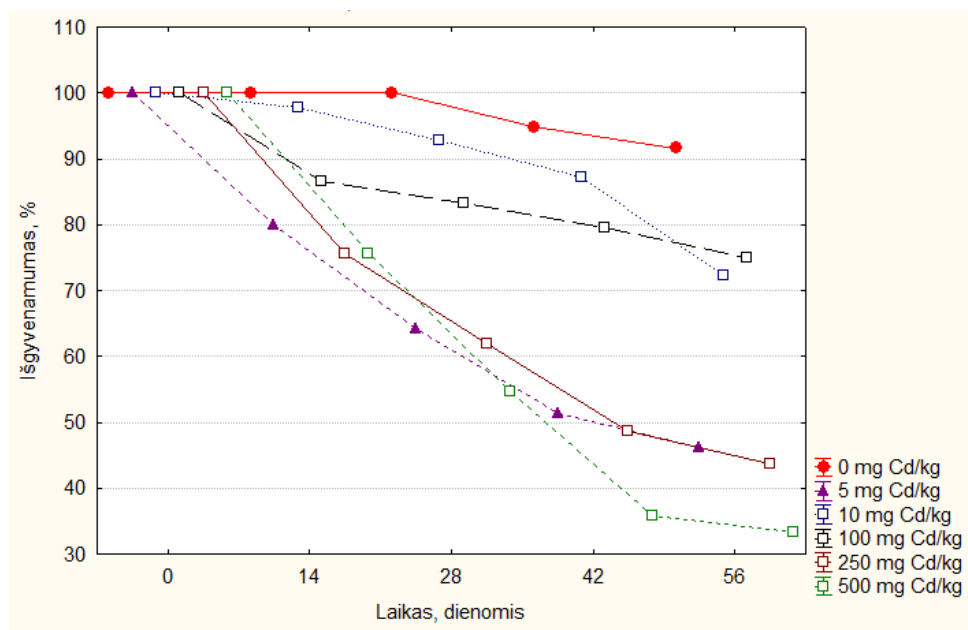
3. REZULTATAI IR JŲ ANALIZĖ

3.1. Kadmio poveikis kompostinio sliekų (*Eisenia fetida*) fiziologiniams rodikliams

Ekspimento metu buvo tiriamas kadmio poveikis kompostinių sliekų *Eisenia fetida* išgyvenamumui. Stebimas išgyvenusių sliekų skaičius po 14, 28, 42 ir 56 dienų. Sliekų išgyvenamumas visose kadmio koncentracijose buvo mažesnis lyginant su kontroline grupe (3.1 pav.). Didėjančios kadmio koncentracijos reikšmingai mažino gyvų sliekų skaičių (po 14 dienų $F=7,95$; po 28 dienų $F=6,32$; po 42 dienų $F=3,99$; po 56 dienų $F=3,90$; ($p<0,05$)).

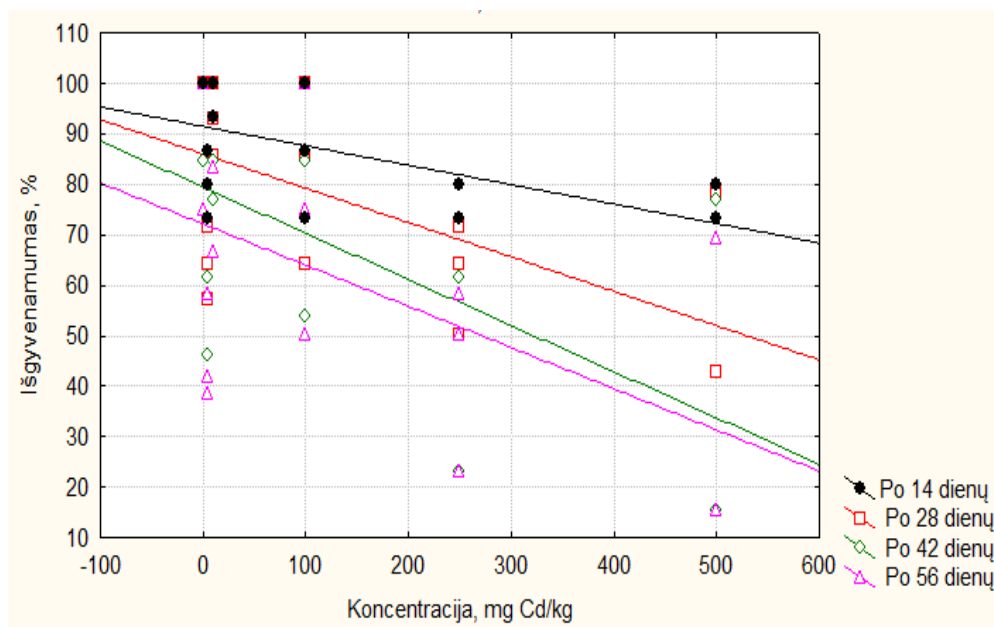
Ilgėjant kadmio poveikio laikui sliekų išgyvenamumas mažėja. Didžiausią poveikį sliekų išgyvenamumui turėjo didžiausios kadmio koncentracijos (250 ir 500 mg Cd/kg). Po 14 dienų poveikio šiomis koncentracijomis sliekų išgyvenamumas siekė 75 %, taigi buvo 15 % mažesnis lyginat su kontroline grupe ($p<0,05$). Pati toksiškiausia sliekams buvo didžiausia kadmio koncentracija (500 mg Cd/kg), šioje koncentracijoje po 28 ir 42 dienų išgyvenamumas atitinkamai siekė 54,76 % ir 35,89 %, o eksperimento pabaigoje (po 56 dienų) buvo gyvi vos 33,33 % testuojamų individų.

Lyginant šio tyrimo rezultatus su ankstesniais tyrimais pastebėta, kad jie itin panašūs į J. Žaltauskaitės ir I. Sodienės (2014). Ten taip pat kenksmingiausia išgyvenamumui buvo didžiausia kadmio 500 mg Cd/kg koncentracija. Ankstesniame tyrime išgyvenamumas toje pat koncentracijoje po 8 savaitių buvo apie 25 %, taigi 1,3 karo mažesnis nei šiame tyrime. Tačiau, reikia atkreipti dėmesį, kad ten kadmiu buvo veikiami sliekų jaunikliai, o ne subrendę sliekai. D. J. Spurgeon et al. (2004) tyrime *Lumbricus rubellus* sliekų jaunikliai buvo veikiami skirtingomis (0, 12,5, 50, 200, 800 mg/kg) kadmio koncentracijomis. Pastebėta, kad visos kadmio koncentracijos neigiamai veikė sliekų išgyvenamumą, kenksmingiausia taip pat buvo didžiausia koncentracija.



3.1 pav. Sliekų *Eisenia fetida* išgyvenamumas dirvožemyje veikiant skirtingomis kadmio koncentracijomis

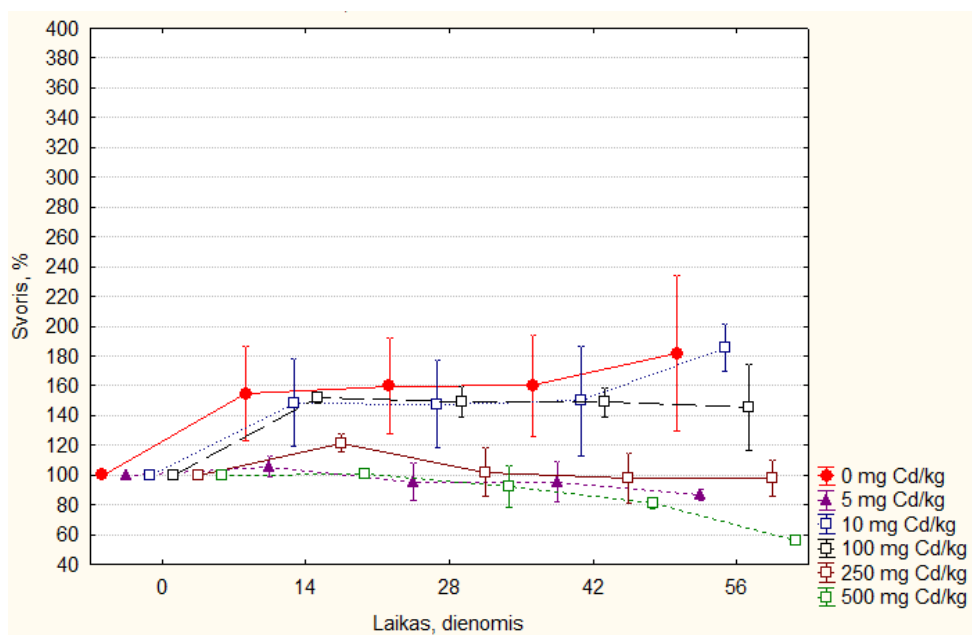
Atlikta koreliacinė analizė (3.2 pav.), parodė kad didėjant kadmio koncentracijoms sliekų išgyvenamumas mažėjo, o ilgėjant poveikio laikui kadmio darė vis didesnę neigiamą poveikį sliekų išgyvenamumui (po 14 dienų = $91,47 - 0,04 \cdot x$, $R^2 = 0,38$; po 28 dienų = $86 - 0,07 \cdot x$, $R^2 = 0,38$; po 42 dienų = $79,42 - 0,09 \cdot x$, $R^2 = 0,36$; po 56 dienų = $72,12 - 0,08 \cdot x$, $R^2 = 0,32$ ($p < 0,05$)).



3.2 pav. *Eisenia fetida* sliekų išgyvenamumo priklausomybė nuo kadmio koncentracijos dirvožemyje

Nustatyto letalios koncentracijos (LC_{50}) parodė, kad ilgėjant poveikio laikui reikalingos vis mažesnės kadmio koncentracijos sukelti 50 % testuojamų individų žūtį. Po 14 dienų kadmio LC_{50} yra 1077,22 mg Cd/kg, po 28 dienų LC_{50} yra 529,38 mg Cd/kg, po 42 dienų LC_{50} yra 349,91 mg Cd/kg, po 56 dienų LC_{50} siekia tik 322,17 mg Cd/kg. Taigi eksperimento pabaigoje (po 56 dienų) norint sukelti 50 % individų žūtį reikalinga 3,34 kartus mažesnė kadmio koncentracija nei po 14 dienų, 1,64 kartus mažesnė nei po 28 dienų ir 1,09 karto mažesnė nei po 42 dienų.

Vertinant kadmio poveikį kompostinių sliekų *Eisenia fetida* svorio pokyčiams, pastebėta, kad tyrimo metu sliekai svorio priaugo tik 0, 10 ir 100 mg Cd/kg koncentracijose, o sliekų svoris sumažėjo 5, 250 ir 500 mg Cd/kg koncentracijose. Pastebėta, kad visose koncentracijose viso tyrimo laikotarpiu sliekų svoris mažėjo arba didėjo statistiškai reikšmingai lyginant su kontroline grupe. Taip pat nustatyta, kad per tiriamąjį laikotarpį, 56 dienas, didėjančios kadmio koncentracijos darė vis didesnę poveikį sliekų svorio kitimui, po 14 dienų $F=16,03$, po 28 dienų $F=17,96$, po 42 dienų $F=12,37$, po 56 dienų $F=10,45$, ($p<0,05$) (3.3 pav.).



3.3 pav. Sliekų *Eisenia fetida* augusių skirtingose kadmio koncentracijose svorio augimo pokytis

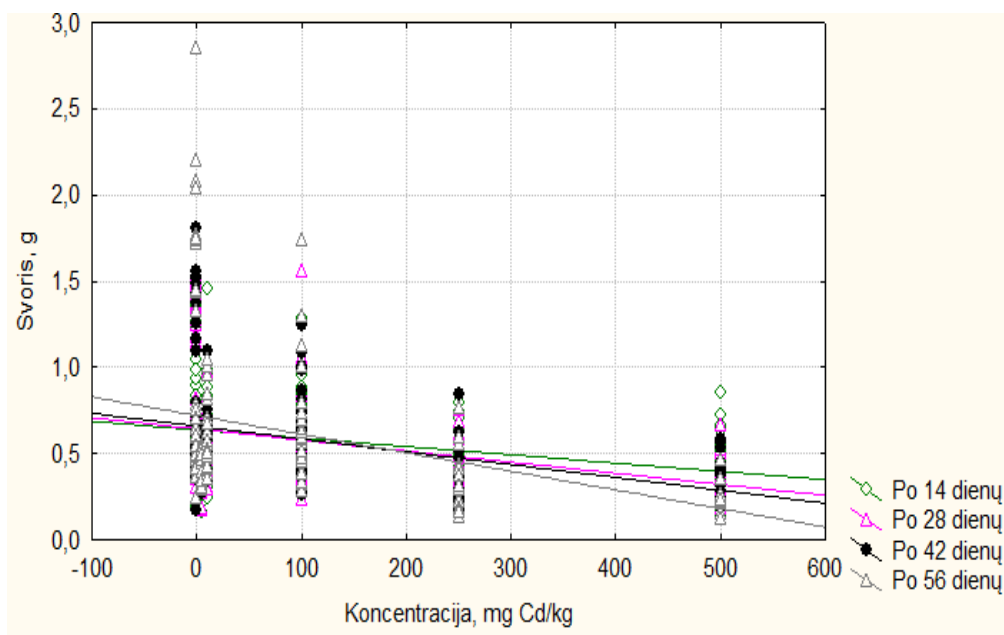
Po 14 dienų visose koncentracijose svoris statistiškai reikšmingai didėjo lyginant su pradiniu svoriu, bet visose koncentracijose buvusių sliekų svoris buvo statistiškai reikšmingai mažesnis nei kontrolinės grupės ($p<0,05$). Pati toksiškiausia po 28 dienų buvo didžiausia koncentracija, ja veikiamų sliekų svoris buvo net 70,25 % statistiškai reikšmingai mažesnis lyginant su kontroline grupe ir 11,16 % mažesnis nei pradinis svoris. Tad galima teigti, kad pirmas 14 dienų sliekai mobilizavo jėgas kovai su teršalais, o po 28 dienų pasireiškė jų svorio sumažėjimas, nes energija nebebuvo skiriama augimui.

Po 42 dienų tik mažiausiose kadmio koncentracijose (5 ir 10 mg Cd/kg) pastebimas nedidelis svorio prieaugis, kitose koncentracijose esančių sliekų svoris ir toliau mažėjo. Eksperimento pabaigoje sliekų svoris statistiškai reikšmingai padidėjo tik kontrolėje, 10 ir 100 mg Cd/kg koncentracijose ir jis buvo atitinkamai net 84,85 %, 39,68 % ir 52,06 % didesnis lyginant su pradiniu sliekų svoriu, tačiau minėtose koncentracijose sliekų svoris buvo statistiškai reikšmingai mažesnis už kontrolinės grupės svorį ($p < 0,05$). Pati toksiškiausia sliekų svoriui po 56 dienų buvo didžiausia 500 mg Cd/kg koncentracija, joje sliekų svoris buvo net 3,23 karto statistiškai reikšmingai mažesnis lyginant su kontroline grupe ir 1,7 karto mažesnis nei pradinis svoris ($p < 0,05$).

Kituose tyrimuose, pavyzdžiui D. J. Spurgeon et al. (1994) taip pat kaip ir šiame tyrime svorio mažėjimas pasireiškia ne iš karto, o tik po ilgesnio poveikio laiko, tačiau didžiausia 300 mg Cd/kg kadmio koncentracija D. J. Spurgeon et al. (1994) tyrime sliekų svorį sumažino jau pirmąsias poveikio savaites, o šiame tyrime veikiant didžiausia 500 mg Cd/kg koncentracija sliekų svoris išliko beveik nepakitęs.

Atlikta koreliacinė analizė parodė (3.4 pav.), kad didėjant kadmio koncentracijoms sliekų svoris mažėjo, o ilgėjant poveikio laikui kadmio darė vis didesnę neigiamą poveikį sliekų svoriui (po 14 dienų = $0,64 - 0,000483 \cdot x$, $R^2 = 0,10$; po 28 dienų = $0,64 - 0,000643 \cdot x$, $R^2 = 0,13$; po 42 dienų = $0,66 - 0,0007744 \cdot x$, $R^2 = 0,12$; po 56 dienų = $0,72 - 0,001078 \cdot x$, $R^2 = 0,12$; ($p < 0,05$)).

Nustatytos efektyvios koncentracijos, sukeliančios augimo sumažėjimą 50 % (EC_{50}), po 14 dienų $EC_{50} = 479,77$ mg Cd/kg, po 28 dienų $EC_{50} = 347,53$ mg Cd/kg, po 42 dienų $EC_{50} = 303,06$ mg Cd/kg, po 56 dienų $EC_{50} = 216,13$ mg Cd/kg. Pati didžiausia EC_{50} nustatyta po 14 dienų. Taigi, akivaizdu, kad ilgėjant poveikio laikui reikalingos vis mažesnės koncentracijos norint sukelti 50 % svorio sumažėjimą.



3.4 pav. *Eisenia fetida* svorio augimo pokytis veikiant kadmio tiriamuoju laikotarpiu

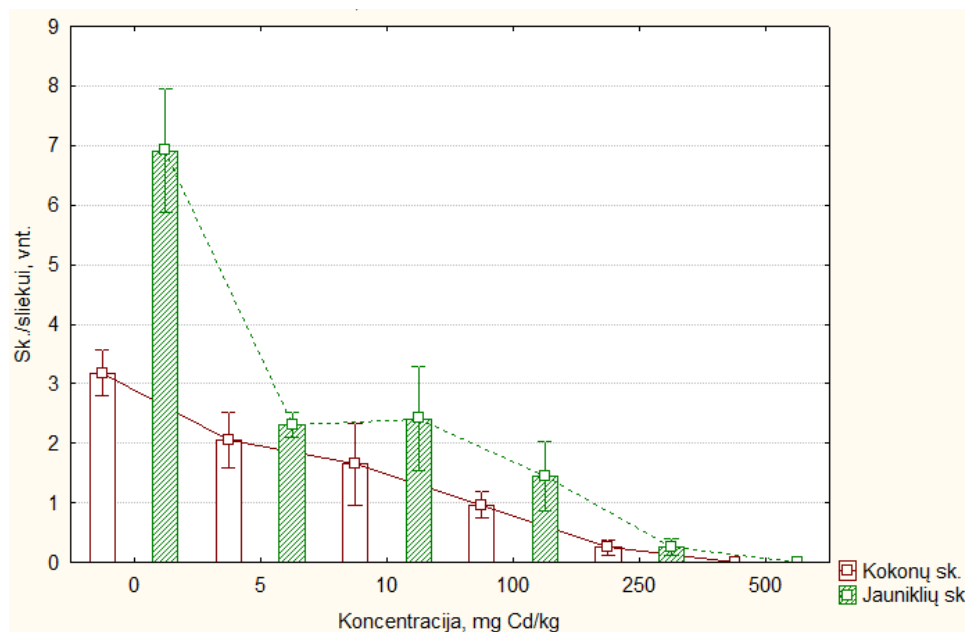
Lyginant letalias (LC_{50}) ir efektyvias kadmio koncentracijas (EC_{50}), sukeliančias svorio slopinimą, nustatyta, kad norint sukelti mirtingumą reikalingos didesnės koncentracijos nei siekiant sukelti augimo mažėjimą 50 %. Po 14 dienų EC_{50} yra 2,25 karto mažesnė nei LC_{50} , po 28 dienų EC_{50} yra 1,52 karto mažesnė nei LC_{50} , po 42 dienų EC_{50} 1,15 karto mažesnė nei LC_{50} , o po 56 dienų EC_{50} 1,49 karto mažesnė už LC_{50} .

Eksperimento metu nustatyta, kad kadmio daro reikšmingą poveikį *Eisenia fetida* sliekų reprodukcijai, o veikiant vis didesnėmis koncentracijomis kokonų ir jauniklių skaičius tenkantis vienam sliekui mažėja, kokonų $F=9,32$, jauniklių $F=16,73$, ($p<0,05$).

100-500 mg Cd/kg koncentracijose buvusių sliekų kokonų skaičius yra statistiškai reikšmingai mažesnis lyginant su kontroline grupe ($p<0,05$). Pačios toksiškiausios kokonams didžiausios 250 ir 500 mg Cd/kg koncentracijos, 250 mg Cd/kg koncentracijoje kokonų skaičius tenkantis vienam sliekui yra 12,54 kartus mažesnis nei kontrolinės grupės. Didžiausioje koncentracijoje kokonų išvis nebuvo rasta.

Kadmio neigiamai paveikė ne tik kokonų, bet ir jauniklių skaičių. Visose kadmio koncentracijose buvusių sliekų jauniklių skaičius buvo statistiškai reikšmingai mažesnis lyginant su kontroline grupe ($p<0,05$). Kenksmingiausios sliekų jaunikliams taip pat didžiausios kadmio koncentracijos (250 ir 500 mg Cd/kg). 250 mg Cd/kg koncentracijoje buvusių jauniklių skaičius buvo net 26,41 kartus mažesnis už kontrolinės grupės. Didžiausioje kadmio koncentracijoje jauniklių kaip ir kokonų rasta nebuvo, taigi galima teigti, kad ši koncentracija visiškai nuslopino reprodukciją.

Atlikus skaičiavimus nustatytos efektyvios koncentracijos (EC_{40}), kurios parodė kokios kadmio koncentracijos po 56 dienų sumažintų reprodukciją 40 %. Kokonų $EC_{40}=159,77$ mg Cd/kg, jauniklių $EC_{40} =80,38$ mg Cd/kg, taigi jaunikliai yra jautresni kadmio poveikiui lyginant su kokonais. Lyginant efektyvias koncentracijas su veiktomis koncentracijomis reikalingos pakankamai didelės kadmio koncentracijos siekiant sukelti reprodukcijos slopinimą.



3.5 pav. Kadmio poveikis sliėkų *Eisenia fetida* kokonų ir jauniklių skaičiui tenkančiam vienam sliėkui

Anksčiau atliktuose tyrimuose taip pat pastebėta, kad didėjančios metalų koncentracijos neigiamai veikia reprodukciją. D. J. Spurgeon et al. (1994) eksperimento metu pačioje didžiausioje 300 mg Cd/kg kadmio koncentracijoje kokonų rasta nebuvo, kaip ir šio tyrimo didžiausioje koncentracijoje. Vėlesniame D. J. Spurgeon et al. (2004) tyrime buvo tiriamas dar didesnės 800 mg Cd/kg koncentracijos poveikis reprodukcijai, kokonų rasta šioje koncentracijoje taip pat nebuvo.

Apibendrinant kadmio poveikį sliėko fiziologiniams rodikliams galima teigti, kad kadmio neigiamai veikia sliėkų išgyvenamumą, augimą ir reprodukciją. Visose kadmio koncentracijose išgyvenamumas buvo mažesnis lyginant su kontroline grupe. Taip pat nustatyto letalios koncentracijos parodė, jog ilgėjant poveikio laikui kadmio toksiškumas didėja ir norint sukelti 50 % testuojamų individų žūti reikalingos vis mažesnės šio teršalo koncentracijos. Įvertinus poveikį kompostinių sliėkų *Eisenia fetida* svorio pokyčiams, pastebėta, kad 10 ir 100 mg Cd/kg koncentracijos buvo mažiau kenksmingos sliėkų augimui, o 5, 250 ir 500 mg Cd/kg koncentracijos tyrimo metu neigiamai paveikė svorį, jį sumažindamos. Efektyvios koncentracijos buvo mažesnės nei letalios, o tai reiškia, kad norint sukelti mirtingumą reikalingos didesnės koncentracijos nei

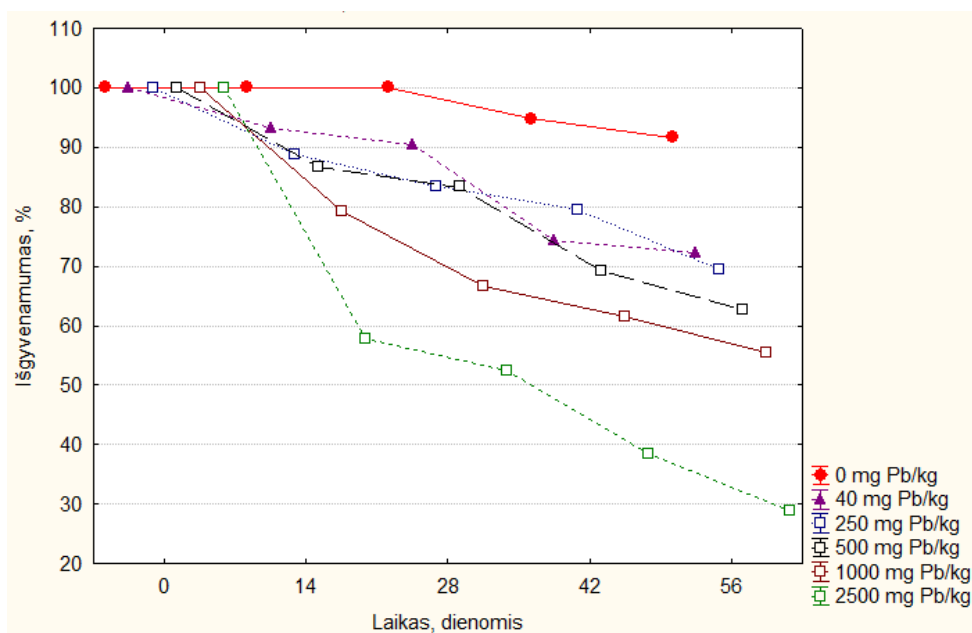
siekiant sukelti svorio sumažėjimą. Be to, laikas taip pat yra svarbus faktorius kadmio toksiškumui pasireikšti, ilgėjant kadmio poveikio laikui sliekų svoris mažėjo. Vertinant reprodukciją pastebėta, kad paveikus vis didesnėmis kadmio koncentracijomis kokonų ir jauniklių skaičius mažėja.

3.2. Švino poveikis kompostinio slieko (*Eisenia fetida*) fiziologiniams rodikliams

Sliekų išgyvenamumas visuose dirvožemio bandiniuose su skirtingomis švino koncentracijomis buvo mažesnis nei kontrolinėje grupėje, tačiau tik 1000 ir 2500 mg Pb/kg koncentracijose skirtumai buvo statistiškai reikšmingi visą tyrimo laikotarpį ($p < 0,05$). Didėjančios švino koncentracijos reikšmingai mažino gyvų sliekų skaičių (po 14 dienų $F=5,67$; po 28 dienų $F=8,89$; po 42 dienų $F=6,42$; po 56 dienų $F=9,12$; ($p < 0,05$)) (3.6 pav.).

Viso eksperimento metu mažiausias išgyvenamumas buvo fiksuojamas didžiausiose 1000 ir 2500 mg Pb/kg koncentracijose. Jau poveikio pradžioje 1000 mg Pb/kg koncentracijoje išgyvenamumas buvo 20,68 % statistiškai reikšmingai mažesnis nei kontrolinės grupės, o 2500 mg Pb/kg koncentracijoje net 42,22 % statistiškai reikšmingai mažesnis už kontrolinės grupės išgyvenamumą.

Eksperimento pabaigoje (po 56 dienų) sliekų išgyvenamumas buvo pats mažiausias. Pati toksiškiausia išliko 2500 mg Pb/kg koncentracija, joje išgyvenamumas siekė vos 28,85 %, šis skaičius net 3,18 kartus mažesnis nei kontrolinės grupės tuo pačiu laikotarpiu ($p < 0,05$).

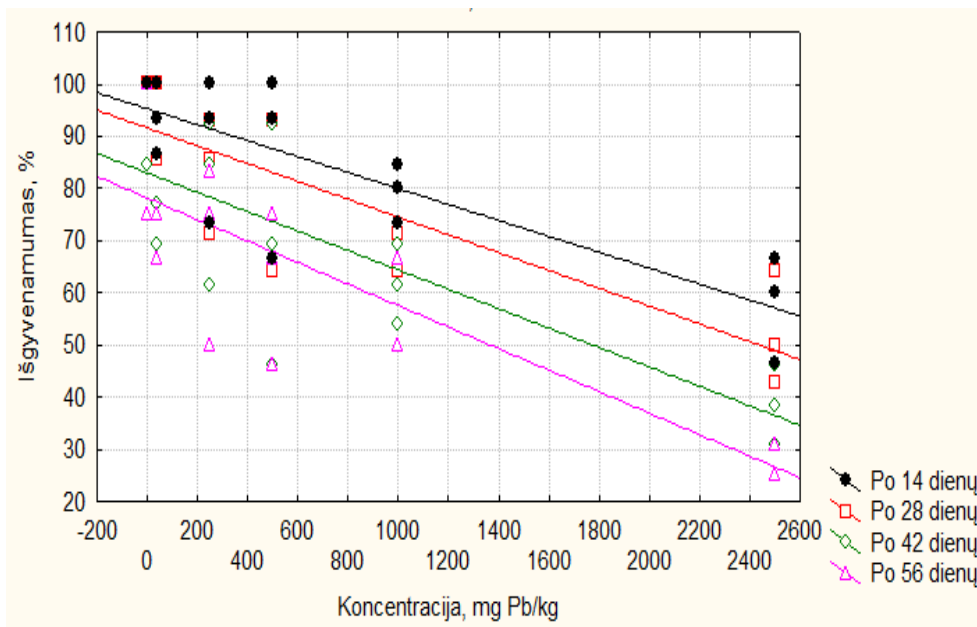


3.6 pav. Sliekų *Eisenia fetida* išgyvenamumas dirvožemyje veikiant skirtingomis švino koncentracijomis

Panašūs rezultatai gauti ir J. Žaltauskaitės ir I. Sodienės (2014) tyrime, ten didžiausias mirtingumas nustatytas 500 1000 ir 2500 mg Pb/ kg koncentracijose. Po 8 savaičių 2500 mg Pb/kg koncentracijoje buvo gyvi vos 30 % sliekų kaip ir šiame tyrime. Nors didžiausią mirtingumą čia sukelia didžiausios koncentracijos, tačiau ir kitos (mažesnės) turi įtakos sliekų išgyvenamumui. Kiek kitokie rezultatai gauti D. J. Spurgeon et al. (1994) tyrime, ten visos švino koncentracijos, išskyrus 10 000 mg Pb/kg nedarė žymaus poveikio sliekų mirtingumui, tačiau tame pačiame tyrime ir yra pabrėžiama, kad mirtingumas nėra tinkamiausias parametras norint nustatyti sunkiųjų metalų toksiškumą.

Atlikta koreliacinė analizė (3.7 pav.), parodė kad didėjant švino koncentracijoms sliekų išgyvenamumas mažėjo, o ilgėjant poveikio laikui švinas darė vis didesnę neigiamą poveikį sliekų išgyvenamumui (po 14 dienų = $95,26 - 0,02 \cdot x$, $R^2 = 0,69$; po 28 dienų = $91,57 - 0,02 \cdot x$, $R^2 = 0,71$; po 42 dienų = $82,96 - 0,02 \cdot x$, $R^2 = 0,62$; po 56 dienų = $78,13 - 0,02 \cdot x$, $R^2 = 0,71$, ($p < 0,05$).

Atlikta regresinė analizė, nustatyta, kad ilgėjant poveikio laikui LC_{50} mažėja, t.y. reikia vis mažesnės švino koncentracijos sukelti 50 % mirtingumą (po 14 dienų LC_{50} yra 2958,03 mg Pb/kg; po 28 dienų LC_{50} yra 2430,80 mg Pb/kg, po 42 dienų LC_{50} yra 1909,90 mg Pb/kg, po 56 dienų LC_{50} yra 1464,33 mg Pb/kg). Taigi, po 14 dienų norint sukelti 50 % individų žūtį reikalinga 2,02 karto didesnė koncentracija nei po 56 dienų, o 28 dienų 1,66 didesnė nei po 56 dienų, o po 42 dienų jau tik 1,3 karto didesnė nei po 56 dienų.



3.7 pav. *Eisenia fetida* sliekų išgyvenamumo priklausomybė nuo švino koncentracijos dirvožemyje

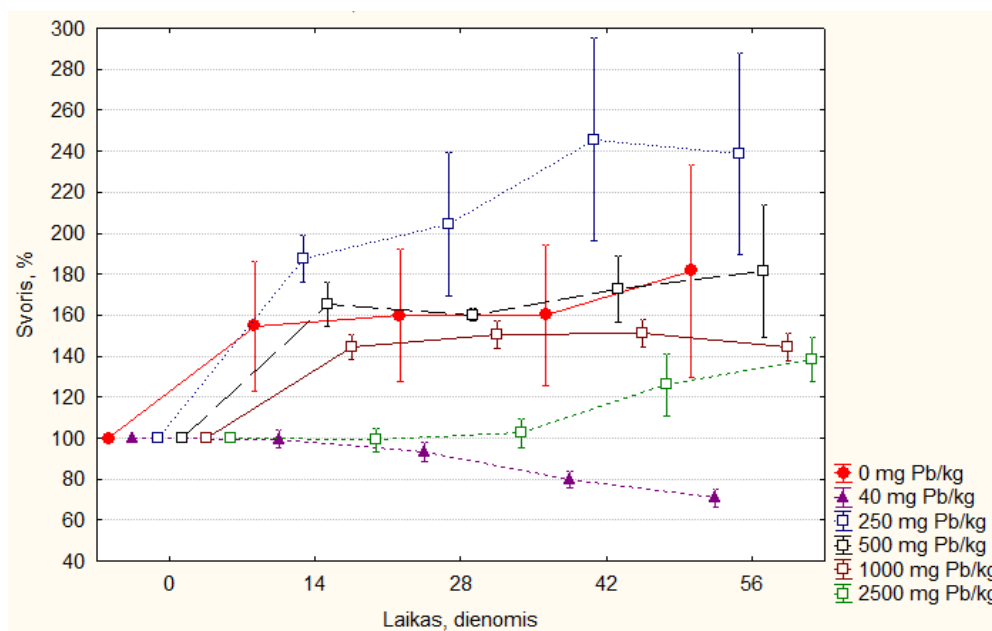
Vertinant švino poveikį kompostinių sliekų *Eisenia fetida* svorio pokyčiams, buvo nustatyta, kad per tiriamąjį laikotarpį (56 dienas), didėjančios švino koncentracijos darė reikšmingą

poveikį sliekų svorio prieaugiui, po 14 dienų $F=11,98$; po 28 dienų $F=9,26$; po 42 dienų $F=6,55$; po 56 dienų $F=6,12$ ($p<0,05$). Po 14 dienų visos švino koncentracijos, išskyrus 40 mg Pb/kg ir 2500 mg Pb/kg nesukėlė sliekų svorio mažėjimo, tačiau pastebimi akivaizdūs svorio prieaugio skirtumai (3.8 pav.).

Mažiausiai toksiška sliekams buvo 250 mg Pb/kg koncentracija, po 14 dienų šioje koncentracijoje buvo nustatytas didžiausias svorio pokytis lyginant su pradiniu svoriu, svoris padidėjo net 86,08 % ir buvo 31,92 % didesnis nei kontrolinės grupės ($p<0,05$).

Po 28, 42 ir 56 dienų didžiausia 2500 mg Pb/kg koncentracija beveik viso eksperimento metu nesukėlė svorio mažėjimo. Ir nors eksperimento pabaigoje sliekų svoris buvo 39,72 % didesnis nei pradinis jis buvo 45,13 % mažesnis lyginant su kontroline grupe ($p<0,05$).

Didžiausią svorio sumažėjimą eksperimento pabaigoje lėmė mažiausia 40 mg Pb/kg koncentracija, sliekų svoris buvo net 2,6 karto mažesnis lyginant su kontroline grupe ir net 28,92 % mažesnis lyginant su pradiniu svoriu ($p<0,05$). Tai, kad ne didžiausia koncentracija, o mažiausia sukėlė svorio sumažėjimą galima paaiškinti remiantis išgyvenamumo analizės rezultatais. Kaip jau buvo minėta anksčiau veikiant 40 mg Pb/kg švino koncentracija išgyvenamumas po 56 dienų buvo didžiausias lyginant su kitose koncentracijose nustatytu išgyvenamumu, taigi sliekai sutelkė energiją tam kad išliktų ir mažai jos buvo panaudota ląstelių augimui. Be to, kaip sliekų bioakumuliacija 40 mg Pb/kg koncentracijoje buvo intensyvesnė.



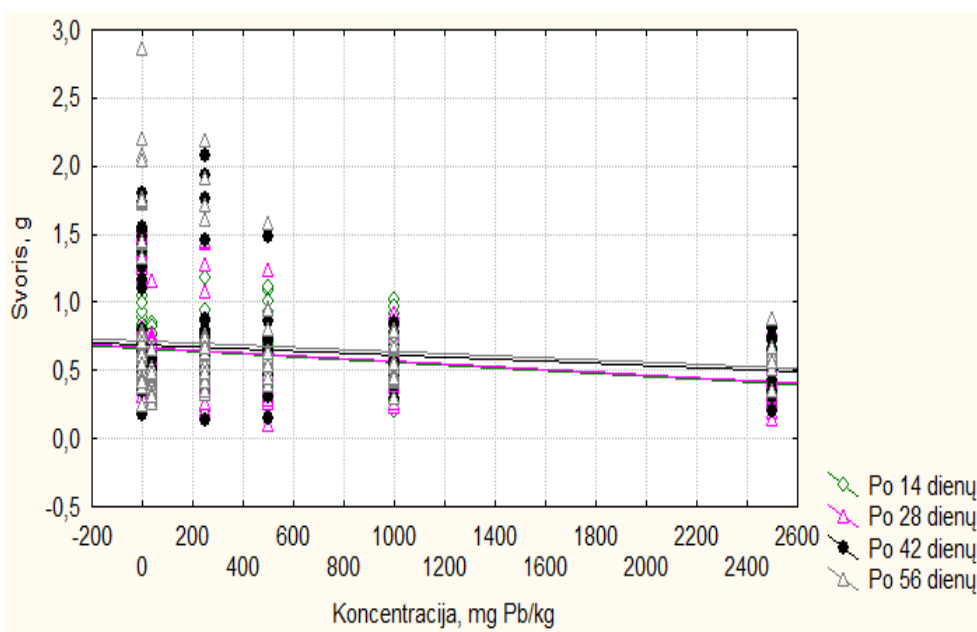
3.8 pav. Sliekų *Eisenia fetida* augusių skirtingose švino koncentracijose svorio augimo pokytis

Kaip jau mainėta anksčiau J. Žaltauskaitės ir I. Sodienės (2014) tyrime sliekai buvo veikiami tokiais pat švino koncentracijomis kaip ir šiame tyrime. J. Žaltauskaitės ir I. Sodienės

tyrime nei viena švino koncentracija, nesukėlė svorio mažėjimo, tačiau viso eksperimento metu sliekų svoris buvo mažesnis lyginant su kontroline grupe. Šiame tyrime taip pat beveik visos išskyrus 40 mg Pb/kg koncentracijos nesukėlė sliekų svorio mažėjimo, tačiau kontrolinėje grupėje augusių sliekų svoris buvo mažesnis lyginant su 250 mg Pb/kg koncentracijoje augusių sliekų svoriu.

Atlikta koreliacinė analizė (3.9 pav.), parodė kad didėjant švino koncentracijoms sliekų svoris mažėjo, o ilgėjant poveikio laikui švinas darė vis didesnę neigiamą poveikį sliekų svariui (po 14 dienų = $0,66 - 0,000102 \cdot x$, $R^2=0,10$, $p<0,05$; po 28 dienų = $0,67 - 0,000101 \cdot x$, $R^2=0,07$, $p<0,05$; po 42 dienų = $0,69 - 0,000076 \cdot x$, $R^2=0,03$, $p<0,05$; po 56 dienų = $0,72 - 0,000078 \cdot x$, $R^2=0,01$, $p>0,05$).

Atlikta regresinė analizė, nustatyta, kad ilgėjant poveikio laikui EC_{50} yra nepastovus ir nuolat kinta. Po 14 dienų EC_{50} lygi 2493,33 mg Pb/kg, po 56 dienų EC_{50} lygi 2936,79 mg Pb/kg. Palyginus efektyvias koncentracijas nustatytas pradžioje su pabaigos pastebėta, kad jos ilgėjant poveikio laikui didėja, vadinasi toksiškumas mažėja.



3.9 pav. *Eisenia fetida* svorio augimo pokytis veikiant švinu tiriamuoju laikotarpiu

Lyginant letalias (LC_{50}) ir efektyvias švino koncentracijas (EC_{50}), sukeliančias svorio slopinimą nustatyta, kad po 14 dienų poveikio letali švino koncentracija yra 1,19 kartus didesnė nei efektyvi, o po 56 dienų letali koncentracija 2 kartus mažesnė nei efektyvi. Tai parodo, kad pradžioje eksperimento svorio kitimas yra jautresnis rodiklis nei išvyvenamumas, o pabaigoje sliekai nusilpsta ir miršta greičiau nei pasireiškia svorio mažėjimas.

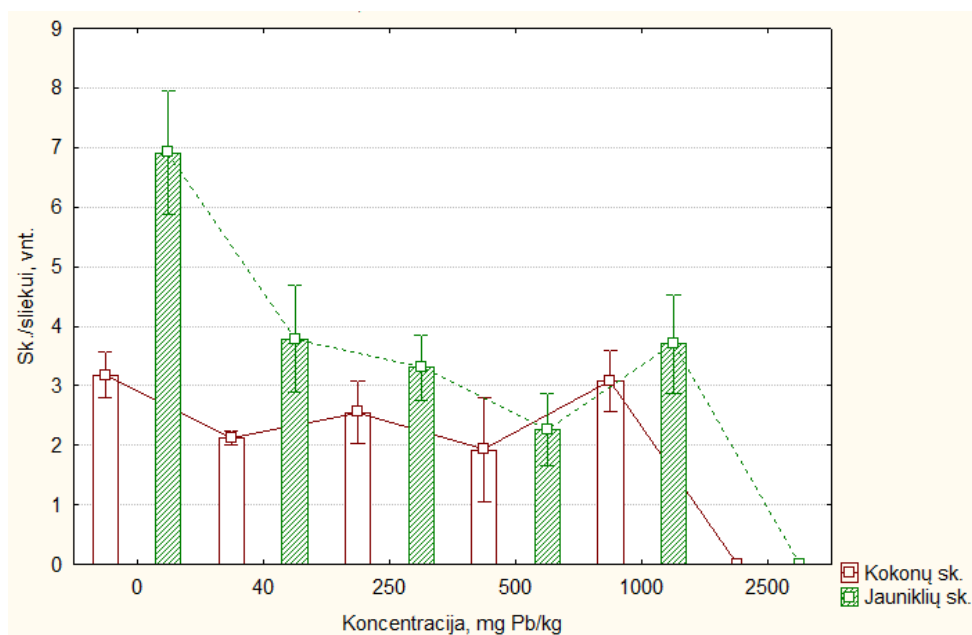
Eksperimento metu nustatyta, kad švinas daro reikšmingą poveikį reprodukcijai, kokonų $F=5,58$, jauniklių $F=9,40$, $p<0,05$. Iš 3.10 pav. pateiktų duomenų matome, kad didėjant švino

koncentracijai nėra konkrečios mažėjimo tendencijos, tačiau visose koncentracijose kokonų skaičius yra mažesnis lyginant su kontroline grupe, nors skirtumai statistškai reikšmingi tik 2500 mg Pb/kg koncentracijoje ($p < 0,05$).

Pati toksiškiausia reprodukcijai didžiausia 2500 mg Pb/kg koncentracija, ten kokonų nebuvo rasta. Mažiausiu toksiškumu kokonams pasižymėjo 1000 mg Pb/kg koncentracija, šioje koncentracijoje kokonų mažai skyrėsi nuo kontrolinės grupės.

Jauniklių skaičius visose koncentracijose buvo žymiai mažesnis nei kontrolinės grupės, skirtumai lyginant su kontroline grupe statistškai reikšmingi 250, 500 ir 2500 mg Pb/kg koncentracijose ($p < 0,05$). Didžiausioje 2500 mg Pb/kg koncentracijoje jauniklių kaip ir kokonų nebuvo rasta, taigi ši koncentracija buvo per daug toksiška reprodukcijai ir visiškai nuslopino reprodukciją.

Atlikus skaičiavimus nustatytos efektyvios koncentracijos (EC_{40}), kurios parodė kokios švino koncentracijos po 56 dienų sumažintų kokonų ir jauniklių skaičių 40 %. Kokonų efektyvi koncentracija $EC_{40} = 1598,11$ mg Pb/kg, jauniklių $EC_{40} = 1013,42$ mg Pb/kg, taigi jaunikliai yra jautresni lyginant su kokonais. Lyginant efektyvias koncentracijas su veiktomis koncentracijomis nustatyta, kad reikalingos pakankamai didelės švino koncentracijos siekiant sukelti reprodukcijos slopinimą.



3.10 pav. Švino poveikis sliekų *Eisenia fetida* kokonų ir jauniklių skaičiui tenkančiam vienam sliekui

Lyginant šio tyrimo rezultatus su J. Žaltauskaitės ir I. Sodienės (2014) tyrimo rezultatais pastebėta, kad šiame tyrime švinas darė mažesnę poveikį reprodukcijai nei J. Žaltauskaitės ir I. Sodienės (2014) tyrime ir vienintelėje 2500 mg Pb/kg koncentracijoje kokonų rasta iš vis nebuvo.

Ankstesniame tyrime vienintelėje 40 mg Pb/kg koncentracijoje vyko reprodukcija. D. J. Spurgeon et al. (1994) tyrime didžiausia koncentracija (1000 mg Pb/kg), taip pat neigiamai paveikė reprodukciją, taigi kokonų joje nebuvo rasta. Remiantis šiais tyrimais galima teigti, kad didelės švino koncentracijos stabdo reprodukciją.

Įvertinus švino poveikį fiziologiniams rodikliams pastebėta, kad vienas iš fiziologinių rodiklių-išgyvenamumas visuose dirvožemio bandiniuose su skirtingomis švino koncentracijomis buvo mažesnis nei kontrolinėje grupėje, toksiškiausios ir didžiausią mirtingumą sukėlė didžiausios švino koncentracijos. Pastebėta, kad ne tik didėjanti koncentracija mažina išgyvenamumą, bet ir švino toksiškumas didėja ilgėjant poveikio laikui. Ištyrus sliekų svorio pokyčius veikiant švinu pastebėta, kad per tiriamąjį laikotarpį, 56 dienas, toksiškiausiam augimui buvo ne didžiausia, o mažiausia švino koncentracija. Lyginant efektyvias švino koncentracijas su letaliomis pastebėta, kad pradžioje eksperimento svorio kitimas yra jautresnis rodiklis nei išgyvenamumas, o pabaigoje sliekai nusilpsta ir miršta greičiau nei pasireiškia svorio mažėjimas. Eksperimento metu nustatyta, kad švinas daro reikšmingą poveikį reprodukcijai, paveikus švinu kokonų ir jauniklių skaičius yra mažesnis nei kontrolinės grupės, o didžiausiose koncentracijose reprodukcija visai nevyksta.

Pagal apskaičiuotas letalias koncentracijas galima nustatyti, kuri medžiaga yra toksiškesnė išgyvenamumui. Eksperimento pradžioje kadmio LC₅₀ 2,75 kartus mažesnė nei švino, o pabaigoje net 4,55 kartus mažesnė nei švino. Taigi, norint sukelti 50 % sliekų žūtį reikalingos mažesnės kadmio koncentracijos nei švino, vadinasi kadmio yra toksiškesnis išgyvenamumui nei švinas.

Įvertinus efektyvias koncentracijas pastebėta, kad norint sukelti sliekų svorio sumažėjimą 50 % (lyginant su kontroline grupe) reikalinga didesnė švino koncentracija nei kadmio. Eksperimento pradžioje kadmio EC₅₀ 5,2 kartus mažesnė nei švino, o pabaigoje net 13,59 kartus mažesnė nei švino. Pagal tai galima spręsti, kad kadmio labiau neigiamai veikia augimą nei švinas.

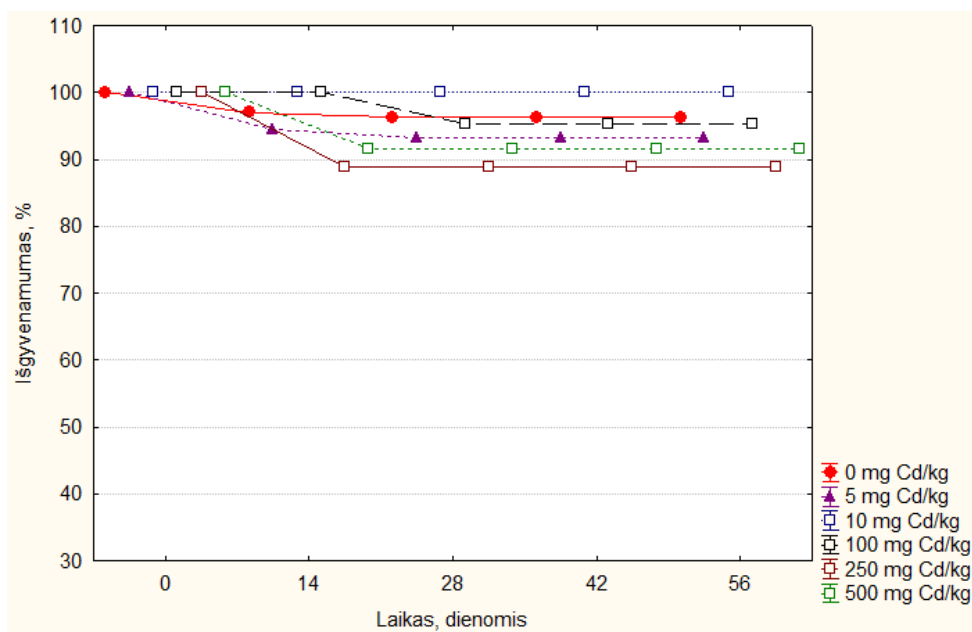
Vertinant švino ir kadmio poveikį reprodukcijai galima palyginti letalias koncentracijas sukeliančias 40 % kokonų ar jauniklių žūtį, lyginant su kontroline grupe. Apskaičiuota, kad švino letalios koncentracijos yra didesnės nei kadmio, norint sukelti 40 % kokonų žūtį reikalinga 10 kartų didesnė švino koncentracija nei kadmio, o norint sukelti 40 % jauniklių žūtį reikalinga 12,61 kartą didesnė švino koncentracija nei kadmio. Taigi, galima daryti išvadą kad švinas yra mažiau toksiškas reprodukcijai lyginant su kadmiu.

3.3. Kompostinio slieko (*Eisenia fetida*) fiziologinių rodiklių atsistatymas po perkėlimo į kadmiu neužterštą dirvožemį

Po 56 dienų poveikio kadmiu gyvi sliekai perkeliama į neužterštą dirvožemį ir stebimas sliekų išgyvenamumas, augimas ir reprodukcija po 14, 28, 42, 56 dienų švariame dirvožemyje.

Atlikus dispersinę analizę nustatyta, kad buvusios kadmio koncentracijos atsistatymo laikotarpiu nedarė statistiškai reikšmingo poveikio sliekų išgyvenamumui ($p>0,05$). Vienintelėje 10 mg/kg koncentracijoje, atsistatymo laikotarpiu, sliekų skaičius išliko nepakitęs viso matavimo laikotarpiu (56 dienas). Kitose koncentracijose sliekų skaičius sumažėjo tik po 14 dienų, tačiau vėlesnių matavimų metu mirusių sliekų nebuvo rasta. Tai reiškia, kad buvusios kadmio koncentracijos neigiamai veikė išgyvenamumą tik pirmas dvi savaites, vėliau sliekai *Eisenia fetida* atsistatė ir sliekų išgyvenamumas nebe priklausė nuo buvusių kadmio koncentracijų (3.11 pav.)

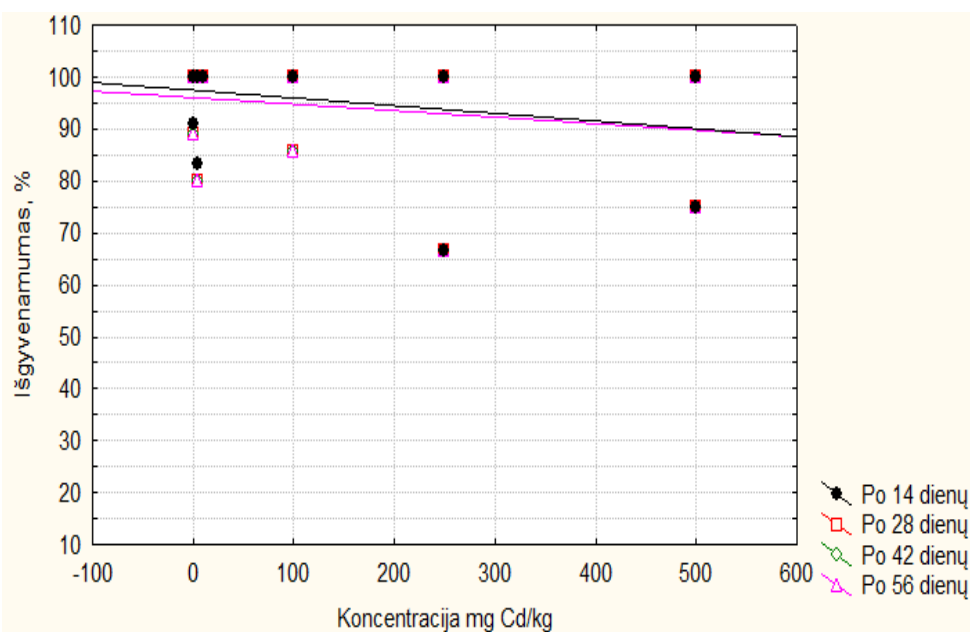
Mažiausias išgyvenamumas nustatytas tuose tyrimo variantuose, kur sliekai buvo veikiami didžiausiomis 250 mg Cd/kg ir 500 mg Cd/kg koncentracijomis. Lyginant buvusią 250 mg Cd/kg koncentraciją su 500 mg Cd/kg koncentracija, pastebėta, jog sliekai sunkiau atsistato po poveikio 250 mg Cd/kg koncentracija.



3.11 pav. Sliekų *Eisenia fetida* išgyvenamumo atsistatymas po perkėlimo į kadmio neužterštą dirvožemį

Tyrimo metu buvo palygintas sliekų išgyvenamumas veikiant kadmio su išgyvenamumu atsistatymo laikotarpiu, buvo pastebėta, kad atsistatymo laikotarpiu mirusių sliekų buvo rasta daug mažiau nei poveikio laikotarpiu. Taip pat, galima teigti kad sliekai paveikti didžiausiomis koncentracijomis (250 ir 500 mg Cd/kg) atsistato sunkiau ir žūsta greičiau, nei paveikti mažesnėmis koncentracijomis (10 ir 100 mg Cd/kg). Apžvelgus šiuos rezultatus galima teigti, kad pašalinus taršą kadmio sliekų mirtingumas mažose koncentracijose sumažėja arba išnyksta, o kuo didesnėmis koncentracijomis buvo paveikti sliekai tuo didesnis mirtingumas stebimas ir po perkėlimo.

Atlikta koreliacinė analizė (3.12 pav.) parodė, kad slielių išgyvenamumas atsistatymo laikotarpiu nekito ($R^2 < 0,08$, $p > 0,05$). O tai reiškia, kad buvusi metalo koncentracija nedaro neigiamo poveikio išgyvenamumui skirtingais atsistatymo matavimo periodais.



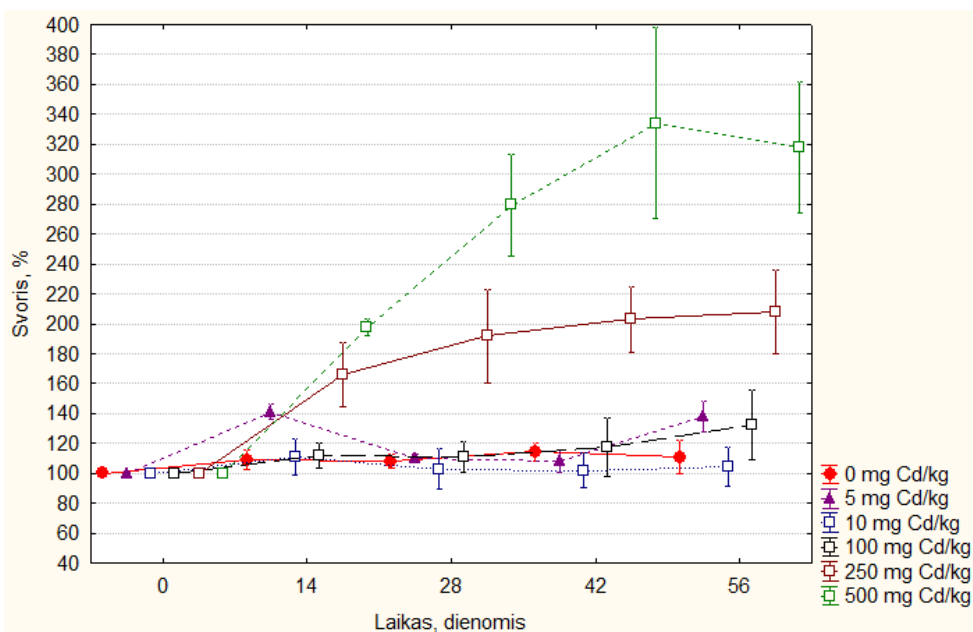
3.12 pav. *Eisenia fetida* slielio išgyvenamumo atsistatymo laikotarpiu priklausomybė nuo buvusios kadmio koncentracijos dirvožemyje

Vertinant slielių *Eisenia fetida* svorio pokyčius atsistatymo laikotarpiu nustatyta, kad po perkėlimo iš kadmio užterštų dirvožemių į švarius dirvožemius slielių svoris augo (3.12 pav.), tačiau buvusios kadmio koncentracijos turėjo statistiškai reikšmingą poveikį slielių svorio pokyčiams atsistatymo periodu, po 14 dienų atsistatymo $F=6,19$, po 28 dienų atsistatymo $F=4,80$, po 42 dienų atsistatymo $F=5,99$, po 56 dienų atsistatymo $F=5,14$ ($p < 0,05$).

Pastebėta, kad visose koncentracijose buvusių slielių, išskyrus pačias didžiausias (250 mg Cd/kg ir 500 mg Cd/kg) koncentracijas, svorio pokytis iš pradžių, t.y. po 14 dienų, staigiai padidėjo, o po to sumažėjo, tačiau svoris nebuvo mažesnis nei pradinis svoris po perkėlimo į švarų dirvožemį. Atsistatymo laikotarpiu buvusiose mažiausiose kadmio koncentracijose (5; 10 ir 100 mg Cd/kg) slielių svorio pokytis buvo artimas kontrolinei grupei, o svorio skirtumai buvo statistiškai reikšmingi lyginant su kontroline grupe ($p < 0,05$).

Atsistatymo laikotarpiu didžiausiomis kadmio koncentracijomis veikti slielai pasižymėjo didžiausiu svorio augimo pokyčiu, slielių svoris visą atsistatymo laikotarpį augo. Po 14 dienų atsistatymo 250 mg Cd/kg ir 500 mg Cd/kg koncentracijose buvusių slielių svoris buvo statistiškai reikšmingai didesnis lyginant su kontroline grupe, atitinkamai 53,36 % ir 87,66 % ($p < 0,05$). Eksperimento pabaigoje, t.y. po 56 dienų 250 mg Cd/kg ir 500 mg Cd/kg koncentracijomis veikusių slielių svorio pokytis atitinkamai buvo 81,25 % ir 187,07 % didesnis lyginant su kontroline grupe.

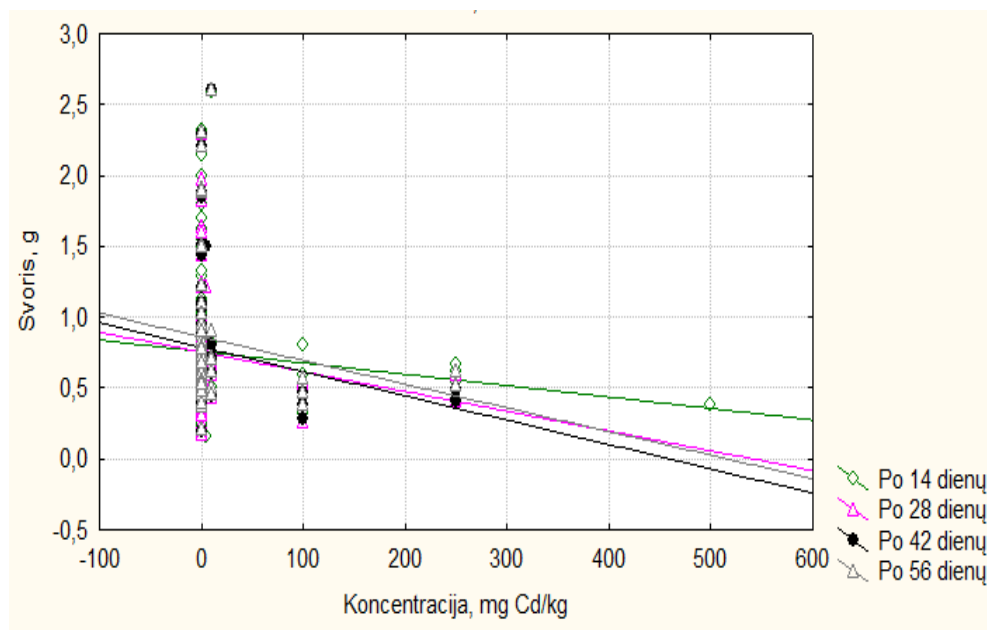
Nors svorio pokyčiai 250 ir 500 mg Cd/kg koncentracijomis veiktų sliekų buvo didesni lyginant su kontroline grupe pats svoris šioje koncentracijoje buvusių sliekų buvo žymiai mažesnis nei kontrolinės grupės. Po 14 dienų atsistatymo 250 mg Cd/kg veiktų sliekų svoris buvo 1,84 kartus, po 28 ir 42 dienų 1,54 kartus, po 56 dienų 1,64 kartus mažesnis lyginant su kontroline grupe. 500 mg Cd/kg koncentracija veikti sliekai atsistatymo laikotarpiu taip pat pasižymėjo daug mažesniu svoriu nei kontrolinės grupės: po 14 dienų svoris buvo 2,20 kartus mažesnis, po 28 dienų 1,55 kartus mažesnis, po 42 dienų 1,40 kartus mažesnis, po 56 dienų 1,56 kartus mažesnis.



3.13 pav. Sliekų *Eisenia fetida* svorio atsistatymas po perkėlimo į kadmio neužterštą dirvožemį

Po 56 dienų 250 mg Cd/kg koncentracijoje nustatytas svoris buvo 95,58 % didesnis nei pradinis sliekų svoris eksperimento pradžioje, prieš poveikį kadmio, 500 mg Cd/kg stebimas dar didesnis svorio atsistatymas, šioje koncentracijoje sliekų svoris buvo net 73,26 % didesnis nei svoris eksperimento pradžioje, prieš poveikį kadmio. Tad galima teigti, kad atsistatymo laikotarpiu svoris ne tik grįžta į pradinę būseną, bet ir tampa didesnis nei pradžioje. Tačiau pažvelgus į kontrolinės grupės svorį eksperimento pradžioje ir pabaigoje pastebimas net dvigubas svorio padidėjimas, taigi nesant stresoriaus, šiuo atveju taršos kadmio, sliekų svoris būtų daug didesnis.

Atlikta koreliacinė analizė parodė (3.14 pav.), kad sliekų svoris mažėjo tik po 14 dienų visose buvusiose kadmio koncentracijose, tačiau kitu atsistatymo laikotarpiu svorio mažėjimo nenustatyta (po 14 dienų atsistatymo = $0,76 - 0,0008 \cdot x$, $R^2 = 0,07$ ($p < 0,05$); po kitų matavimų $R^2 < 0,02$ ($p > 0,05$).

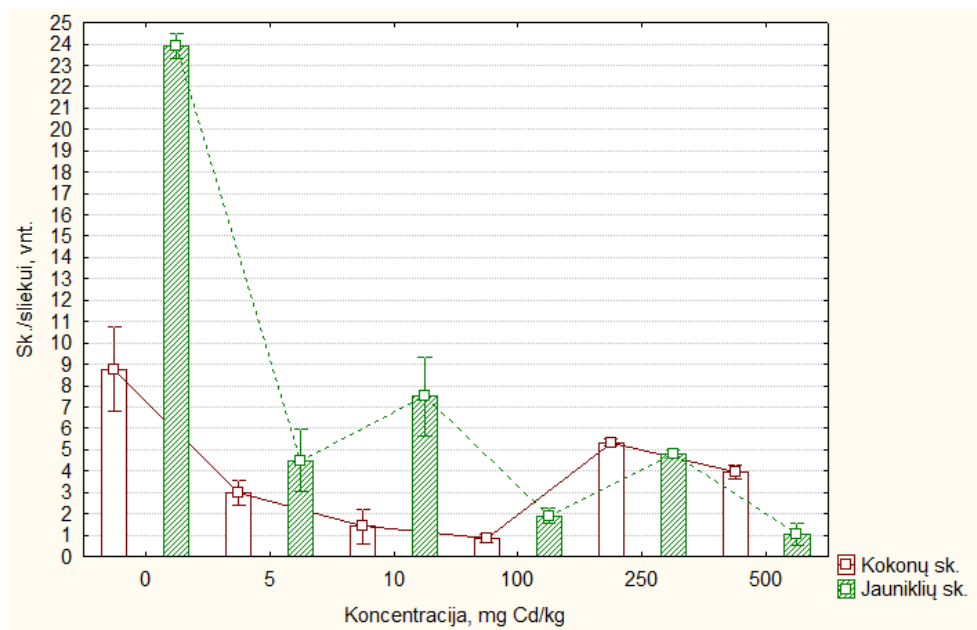


3.14 pav. *Eisenia fetida* sliekų svorio atsistatymo laikotarpiu priklausomybė nuo buvusios kadmio koncentracijos dirvožemyje

Atsistatymo eksperimento metu nustatyta, kad buvusios kadmio koncentracijos statistiškai reikšmingai mažino kokonų ir jauniklių skaičių, atitinkamai $F=10$, $F=68,95$ ($p<0,05$) (3.15 pav.).

Vertinant sliekų reprodukciją atsistatymo laikotarpiu, nustatyta, kad mažiausiai kokonų rasta buvusioje 100 mg Cd/kg koncentracijoje. Šioje buvusioje koncentracijoje kokonų skaičius 10,02 kartus mažesnis nei kontrolinėje grupėje. Daugiausiai kokonų atsistatymo laikotarpio rasta buvusioje 250 mg Cd/kg koncentracijoje, kokonų skaičius buvo tik 1,64 kartus mažesnis už kontrolinės grupės. Nustatyta, kad skirtumai tarp kontrolinėje grupėje buvusių kokonų skaičiaus ir kokonų skaičiaus buvusiose kadmio koncentracijose (išskyrus 250 ir 500 mg Cd/kg) yra statistiškai reikšmingi ($p<0,05$).

Atsistatymo eksperimento metu buvo vertinamas ne tik kokonų, bet ir jauniklių skaičius, tarp paveiktų kadmio jauniklių skaičius ir kontrolinės grupės jauniklių skaičiaus nustatytas statistiškai reikšmingas skirtumas ($p<0,05$). Pastebėta, kad atsistatymo laikotarpiu buvusios 5 ir 250 mg Cd/kg koncentracijos darė mažiausią įtaką jauniklių skaičiui tenkančiam vienam sliekui. Atsistatymo laikotarpiu buvusi didžiausia koncentracija (500 mg Cd/kg) buvo itin toksiška jaunikliams ir jų skaičius tenkantis vienam sliekui buvo net 22,65 kartus mažesnis nei kontrolinės grupės ($p<0,05$).



3.15 pav. Sliekų *Eisenia fetida* kokonų ir jauniklių skaičius tenkantis vienam sliekui po perkėlimo į kadmio neužterštą dirvožemį

Lyginant kokonų ir jauniklių skaičių po 8 savaičių poveikio kadmio su kokonų ir jauniklių skaičiumi po 8 savaičių atsistatymo galima teigti, kad po atsistatymo kokonų skaičius buvo didesnis visose buvusiose koncentracijose, išskyrus 10 ir 100 mg Cd/kg, o jauniklių skaičius po atsistatymo buvo didesnis visose buvusiose koncentracijose, taigi kadmio poveikis yra toksiškas reprodukcijai, o po atsistatymo reprodukcija nors ir nepasiekia kontrolės lygio, tačiau intensyvėja.

Kaip jau minėta anksčiau, C.A.M. van Gestel et al. (1993) tyrime sliekai *Eisenia andrei* buvo veikiami 0, 10, 18, 32, 56, 100 mg Cd/kg koncentracijomis, po 21 dienos poveikio jie perkeliama 21 dienai į švarų dirvožemį, vertinama reprodukcija po poveikio kadmio ir po atsistatymo. Galima atkreipti dėmesį, kad dalis gautų rezultatų buvo ir panašūs į šį tyrimą, o dalis skyrėsi. Po perkėlimo sliekai pasižymėjo žymiai geresne reprodukcija nei po poveikio kadmio, tačiau skirtumas tas, kad buvusioje 10 mg Cd/kg koncentracijoje mūsų tyrime jauniklių skaičius buvo žymiai didesnis nei kitose, o C.A.M. van Gestel et al. (1993) tyrime buvusi 10 mg Cd/kg koncentracija buvo kenksmingiausia jaunikliams.

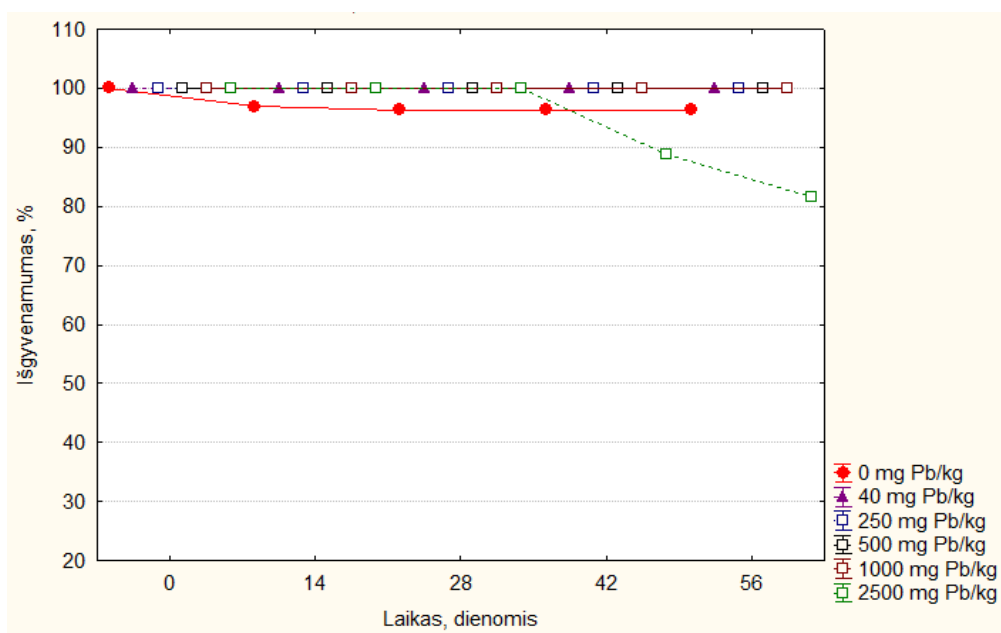
Apibendrinant *Eisenia fetida* sliekų fiziologinių rodiklių atsistatymą po poveikio kadmio pastebėta, kad buvusios kadmio koncentracijos neigiamai veikė išgyvenamumą ir augimą tik pirmas dvi savaites, vėliau sliekai *Eisenia fetida* atsistatė ir sliekų išgyvenamumas bei svoris nebe priklausė nuo buvusių kadmio koncentracijų. Sliekai paveikti didžiausiomis koncentracijomis atsistato sunkiau ir žūsta greičiau, nei paveikti mažesnėmis koncentracijomis. Vertinant sliekų *Eisenia fetida* svorio pokyčius atsistatymo laikotarpiu nustatyta, kad po perkėlimo iš kadmio užterštų dirvožemių į švarius dirvožemius sliekų svoris augo. Buvusiose mažiausiose kadmio koncentracijose sliekų

svorio pokytis buvo artimas kontrolinei grupei, o didžiausiose koncentracijose sliekų svoris visą atsistatymo laikotarpį augo ir nors svorio pokytis buvo didesnis už kontrolinės grupės, pats sliekų svoris buvo mažesnis. Pastebėta, kad kadmio atsistatymo laikotarpiu neigiamai veikia ne tik išgyvenamumą ar augimą, bet ir reprodukciją. Lyginant reprodukciją poveikio laikotarpiu su reprodukcija po atsistatymo pastebėta, kad reprodukcija veikiant kadmiu buvo žymiai lėtesnė nei atsistatymo laikotarpiu.

3.4. Kompostinio slieko (*Eisenia fetida*) fiziologinių rodiklių atsistatymas po perkėlimo į švinu neužterštą dirvožemį

Atsistatymo laikotarpiu buvo tiriamas buvęs švino poveikis kompostinio slieko *Eisenia fetida* išgyvenamumui. Stebimas išgyvenusių individų skaičius po 14, 28, 42 ir 56 dienų. Atlikus dispersinę analizę nustatyta, kad buvusios švino koncentracijos po perkėlimo nedarė statistiškai reikšmingo poveikio sliekų išgyvenamumui ($p > 0,05$) (3.16 pav.).

Nei viena buvusi koncentracija, išskyrus pačią didžiausią švino koncentraciją (2500 mg Pb/kg) ir kontrolinę grupę nesukėlė mirtingumo ir gyvų sliekų skaičius išliko nepakitęs. Atsistatymo laikotarpiu pačioje didžiausioje koncentracijoje buvusių sliekų skaičius sumažėjo tik po 42 dienų, tačiau statistiškai reikšmingo skirtumo lyginant su kontroline grupe nenustatyta ($p < 0,05$).

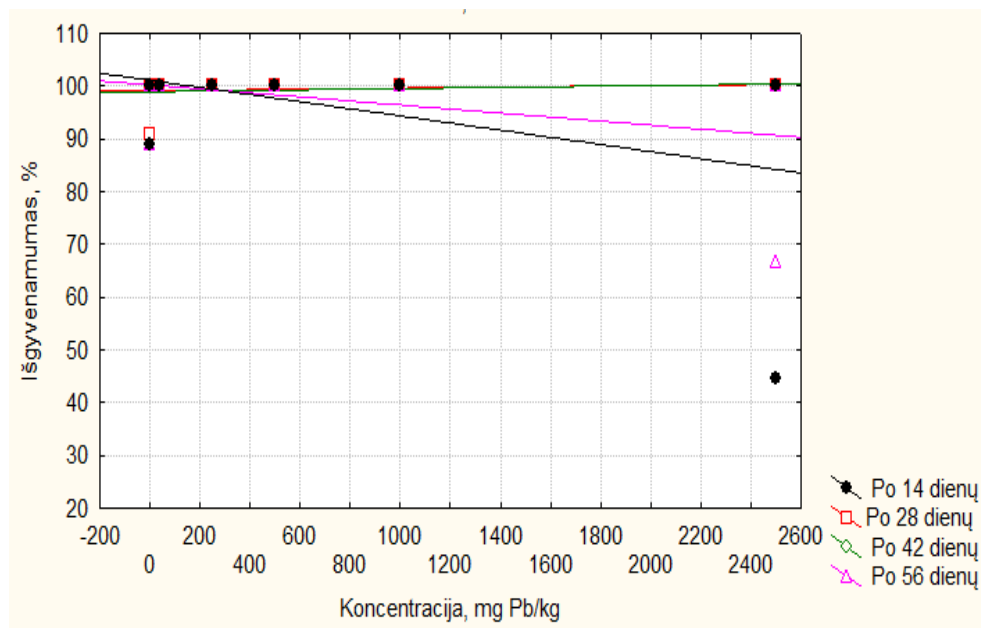


3.16 pav. Sliekų *Eisenia fetida* išgyvenamumo atsistatymas po perkėlimo į švinu neužterštą dirvožemį

Palyginus sliekų išgyvenamumą po poveikio švinu su išgyvenamumu atsistatymo laikotarpiu pastebima, kad sliekų išgyvenamumas atsistatymo laikotarpiu daug didesnis nei veikiant švinu. Ir nors atsistatymo laikotarpiu buvusioje didžiausioje koncentracijoje (2500 mg Pb/kg) sliekų

skaičius buvo mažiausias, bet jis buvo net 52,63 % didesnis nei po 8 savaičių švino poveikio nustatytas sliekų skaičius, tai reiškia, kad sliekai pašalinus stresorių gali atsistatyti ir išgyventi.

Atlikta koreliacinė analizė (3.17 pav.) parodė, kad sliekų išgyvenamumas atsistatymo laikotarpiu buvusiose švino koncentracijose nekito ($R^2 < 0,21$, $p > 0,05$). O tai reiškia, kad buvusi metalo koncentracija nedarė neigiamo poveikio išgyvenamumui skirtingais atsistatymo matavimo periodais.



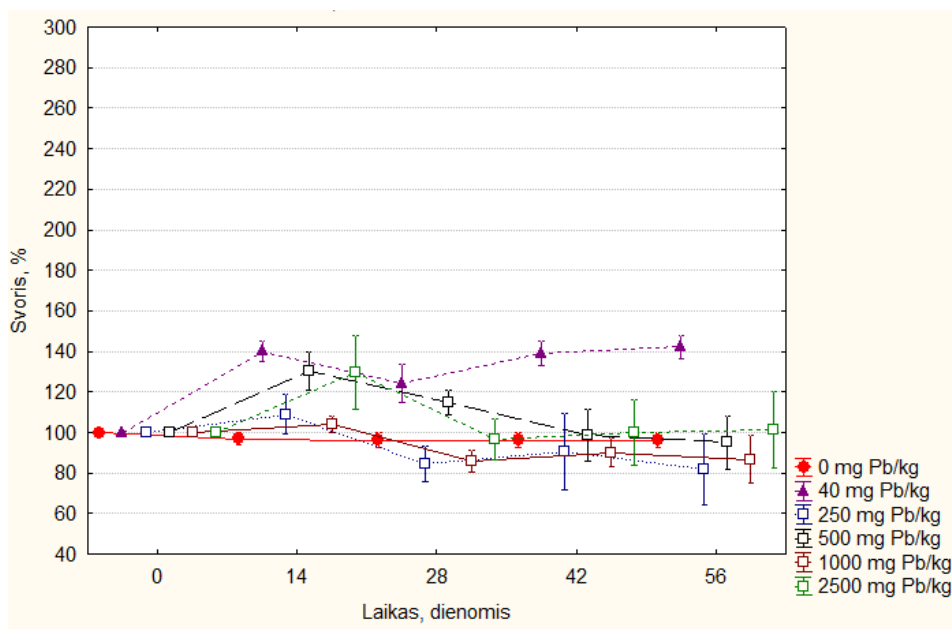
3.17 pav. *Eisenia fetida* sliekų išgyvenamumo atsistatymo laikotarpiu priklausomybė nuo buvusios švino koncentracijos dirvožemyje

Vertinant sliekų *Eisenia fetida* svorio pokyčius atsistatymo laikotarpiu nustatyta, kad po perkėlimo į švinu neužterštą dirvožemį sliekų svoris kito netolygiai, tačiau pastebėta, kad buvusios švino koncentracijos turėjo statistiškai reikšmingą poveikį sliekų svorio atsistatymui, po 14 dienų $F=4,78$, po 28 dienų $F=6,12$, po 42 dienų $F=5,62$, po 56 dienų $F=6,58$ ($p < 0,05$) (3.18 pav.).

Sliekų svoris atsistatymo laikotarpiu nuolat kito ir pasibaigus eksperimentui tik 40 mg Pb/kg koncentracijoje bei kontrolėje nustatytas didžiausias svorio prieaugis. Po 14 dienų didžiausias svorio padidėjimas nustatytas buvusioje 40 mg Pb/kg koncentracijoje, jis buvo statistiškai reikšmingai 28,67 % didesnis nei kontrolinėje grupėje buvusių sliekų svorio pokytis. Ir nors svorio pokytis buvusioje 40 mg Pb/kg koncentracijoje buvo didesnis nei kontrolės, pats svoris tuo laikotarpiu buvo net 1,86 mažesnis nei kontrolinės grupės sliekų.

Po 56 dienų poveikio didžiausias svorio prieaugis nustatytas buvusioje mažiausioje švino koncentracijoje, svoris buvo net 41,54 % didesnis už svorį pradžioje atsistatymo ir 19,35 % statistiškai reikšmingai didesnis už kontrolinės grupės sliekų svorį. Buvusiose didžiausiose švino koncentracijose (1000 ir 2500 mg Pb/kg) sliekų svoris buvo mažiausias. Buvusioje 1000 mg Pb/kg

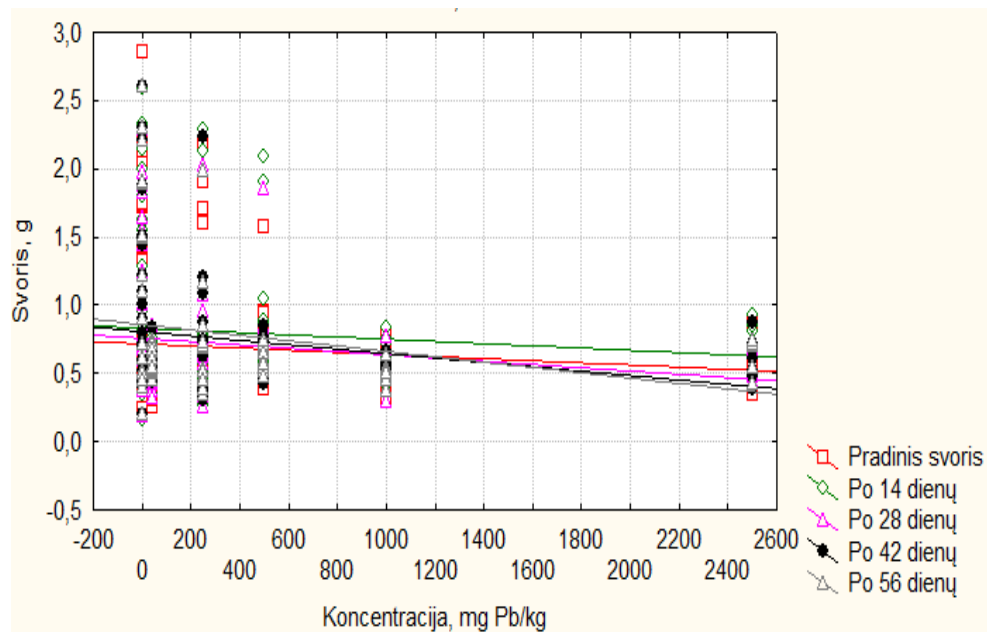
koncentracijoje sliekų svoris buvo 14,91% mažesnis už svorį atsistatymo pradžioje ir 37,11% statistiškai reikšmingai mažesnis už kontrolinės grupės svorį eksperimento pabaigoje ($p < 0,05$). Po 56 dienų buvusioje 2500 mg Pb/kg koncentracijoje sliekų svoris buvo 23,31% didesnis nei kontrolės, bet mažai skyrėsi nuo svorio atsistatymo pradžioje, tai parodo, kad sliekai paveikti didžiausia koncentracija atsistato lėtai.



3.18 pav. Sliekų *Eisenia fetida* svorio atsistatymas po perkėlimo į švinu neužterštą dirvožemį

Lyginant sliekų svorį atsistatymo pabaigoje su sliekų svoriu prieš švino poveikį nustatyta, kad sliekų svoris ne tik grįžta į pradinę būseną, bet ir tampa didesnis nei buvo pradžioje. Mažiausias svorio padidėjimas nustatytas mažiausioje 40 mg Pb/kg koncentracijoje, didžiausias svorio atsistatymas nustatytas 250 mg Pb/kg koncentracijoje. 250 mg Pb/kg koncentracija veiktų sliekų svoris buvo net 119,74% didesnis už pradinį svorį, prieš paveikiant švinu. Panašus atsistatymas nustatytas 1000 mg Pb/kg ir 2500 mg Pb/kg koncentracijose, jose svoris buvo atitinkamai 22,62% ir 36,49% didesnis nei pradinis svoris prieš poveikį švinu.

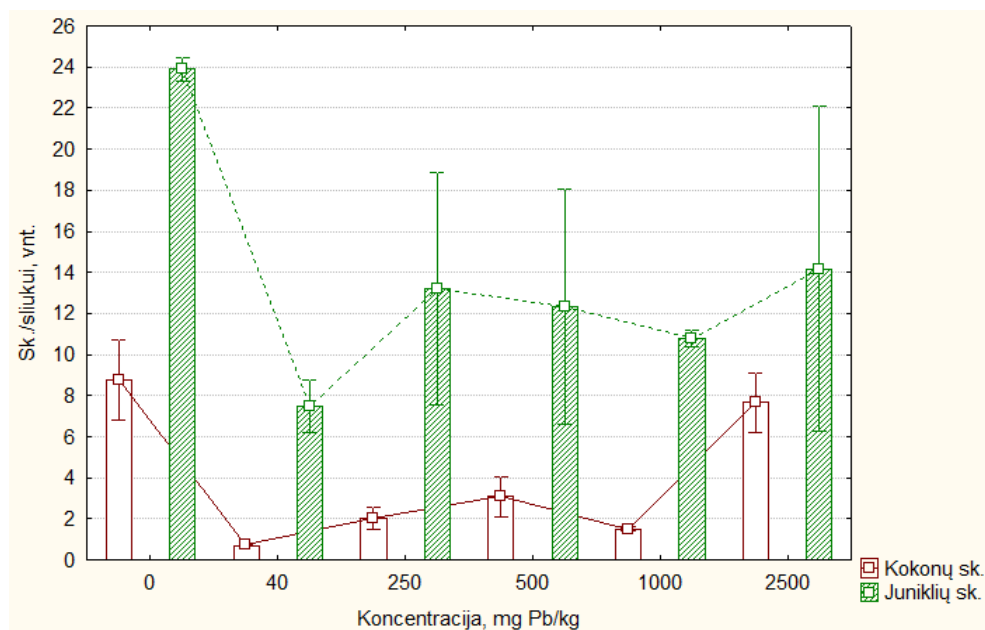
Atlikta koreliacinė analizė parodė (3.19 pav.), kad sliekų svoris mažėjo tik po 42 ir 56 dienų visose buvusiose švino koncentracijose, tačiau kitu atsistatymo laikotarpiu svorio mažėjimo nenustatyta (po 14 ir 28 dienų $R^2 < 0,04$, $p < 0,05$; po 42 dienų $= 0,81 - 0,0002 \cdot x$, $R^2 = 0,05$, $p < 0,05$; po 56 dienų $= 0,86 - 0,0002 \cdot x$, $R^2 = 0,06$ ($p < 0,05$). Iš pateiktų duomenų matyti, kad buvusioms švino koncentracijoms pasireikšti reikalingas ilgesnis laikotarpis.



3.19 pav. *Eisenia fetida* sliekos svorio atsistatymo laikotarpiu priklausomybė nuo buvusios švino koncentracijos dirvožemyje

Eksperimento metu nustatyta, kad buvusios švino koncentracijos statistiškai reikšmingai mažino kokonų skaičių $F=9,57$ ($p<0,05$). Lyginant švinu (40, 250 ir 1000 mg Pb/kg) veiktų kokonų skaičių su kontrolinės grupės kokonų skaičiumi nustatytas statistiškai reikšmingas skirtumas ($p<0,05$). Mažiausiai kokonų buvo rasta buvusioje mažiausioje švino koncentracijoje (40 mg Pb/kg), šioje koncentracijoje kokonų buvo 12,25 kartus mažiau nei kontrolinėje grupėje. Daugiausiai kokonų po atsistatymo rasta didžiausioje 2500 mg Pb/kg koncentracijoje, kokonų skaičius mažai skyrėsi nuo kontrolės. Tai, kad daugiausiai kokonų nustatyta ne mažiausioje, o didžiausioje švino koncentracijoje gali būti susiję su tuo jog visa energija atsistatymo metu mažiausioje koncentracijoje teko augimui.

Po atsistatymo įvertinus buvusių švino koncentracijų poveikį jauniklių skaičiui nustatyta, kad švinas daro nežymų statistiškai reikšmingą poveikį jauniklių skaičiui. Nors po atsistatymo jauniklių skaičius yra didesnis nei po poveikio švinu, tačiau išlieka mažesnis nei kontrolinėje grupėje.



3.20 pav. Sliekų *Eisenia fetida* kokonų ir jaunikių skaičius tenkantis vienam sliekui po perkėlimo į švinu neužterštą dirvožemį

Lyginant kokonų skaičių po 8 savaičių poveikio švinu su kokonų ir skaičiumi po 8 savaičių atsistatymo galima teigti, kad švinas neigiamai paveikė kokonų skaičių ir kokonų produkcija neatsistatė. Išsiritusių jaunikių skaičius visose buvusiose koncentracijose atsistatymo laikotarpiu buvo didesnis nei po poveikio švinu.

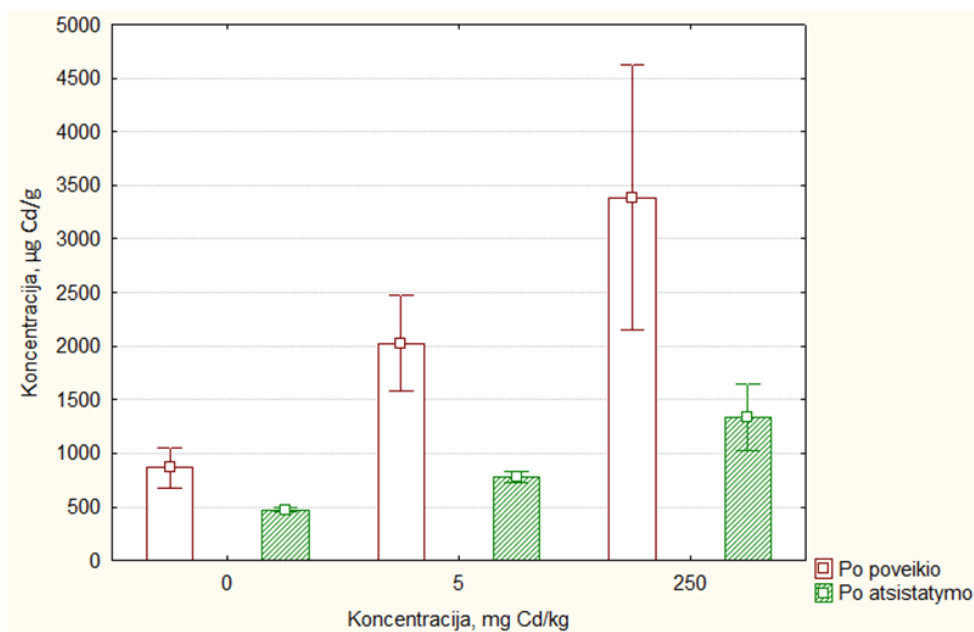
Apibendrinant rezultatus galima teigti, kad buvusios švino koncentracijos po perkėlimo į švarų dirvožemį nedarė statistiškai reikšmingo poveikio sliekų išgyvenamumui. Vertinant sliekų svorio pokyčius atsistatymo laikotarpiu pastebėta, kad buvusios švino koncentracijos turėjo statistiškai reikšmingą poveikį sliekų svorio atsistatymui. Sliekų svoris atsistatymo laikotarpiu nuolat kito ir pasibaigus eksperimentui tik mažiausioje koncentracijoje bei kontrolėje buvo nustatytas svorio prieaugis, kitur svoris sumažėjo. Buvusiose didžiausiose švino koncentracijose sliekų svoris buvo mažiausias. Koreliacinė analizė parodė, kad sliekų svorio sumažėjimas nustatytas tik eksperimento pabaigoje, vadinasi buvęs neigiamas švino poveikis pasireiškė tik po ilgesnio laiko. Atsistatymo metu buvęs švino poveikis labiau neigiamai paveikė kokonų produkciją, jaunikių skaičiui buvęs švino poveikis darė mažesnę poveikį.

3.5. Kadmio ir švino bioakumuliacija sliekų audiniuose ir metalų koncentracijų sliekuose pokytis atsistatymo periodu

Tyrimo metu buvo įvertinta bioakumuliacija sliekų audiniuose po 56 dienų poveikio 0, 5, 250 mg Cd/kg koncentracijomis ir biokoncentracijos po 56 dienų atsistatymo periodo. Nustatyta, kad didėjant kadmio koncentracijai dirvožemyje kadmio koncentracijos sliekų audiniuose taip pat

didėja. 5 mg Cd/kg koncentracijoje buvę sliekai sukaupė 2,35 kartus didesnę kiekį metalo lyginant su kontroline grupe. Daugiausiai kadmio buvo sukaupta sliekuose, kurie buvo paveikti 250 mg Cd/kg koncentracija, sukauptas kiekis buvo 3,92 kartus didesnis už kontrolinės grupės kiekį ir 1,67 kartus didesnis už 5 mg Cd/kg koncentracijoje buvusių sliekų metalo kiekį audiniuose (3.21 pav.).

Šie rezultatai parodo, kad kuo didesne koncentracija bus paveikti sliekai tuo didesnis metalo kiekis susikaups audiniuose ir sukels jau anksčiau darbe nustatytus ar analizuotus efektus: mažesnę išgyvenamumą bei reprodukcijos ir svorio augimo slopinimą.

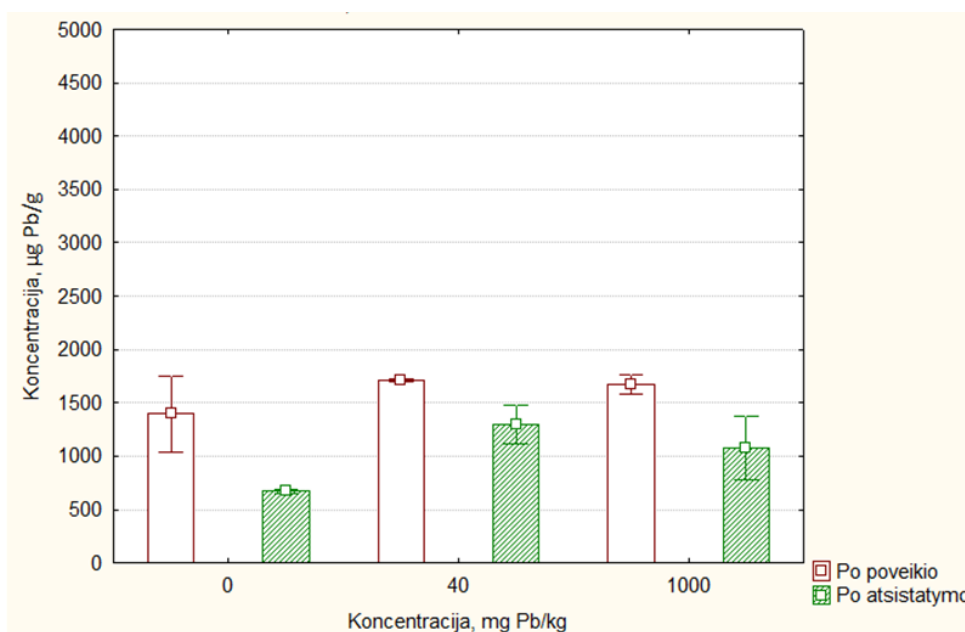


3.21 pav. Bioakumuliacija sliekų audiniuose po poveikio kadmiu ir po atsistatymo

Po 56 dienų atsistatymo kadmio kiekis sumažėjo visomis buvusiomis kadmio koncentracijomis veikty sliekų audiniuose (5 mg Cd/kg koncentracijoje sumažėjo 2,60 kartus, 250 mg Cd/kg koncentracijoje sumažėjo 2,54 kartus). Buvusioje 250 mg Cd/kg koncentracijoje kadmio kiekis išliko 1,72 kartus didesnis nei 5 mg Cd/kg koncentracijoje ir 2,82 kartus didesnis nei kontrolėje. Taigi paveikti mažomis koncentracijomis sliekai išsivalo geriau nei paveikti didelėmis koncentracijomis. Nors kadmio koncentracija audiniuose po atsistatymo sumažėjo, tačiau kontrolės kiekio nepasiekė, o tai galėjo lemti silpnesnę reprodukcijos ir svorio atsistatymą.

Vertinant švino bioakumuliaciją sliekų audiniuose nustatyta, kad veikiant 40 ir 1000 mg Pb/kg koncentracijomis švino koncentracija audiniuose buvo atitinkamai 1,23 kartus ir 1,20 kartus didesnė lyginant su kontroline grupe. 40 mg Pb/kg koncentracija veikti sliekai sukaupė audiniuose daugiau kadmio nei veikti 1000 mg Pb/kg koncentracija, tai galėjo lemti geresnis mažų koncentracijų pasisavinimas (3.22 pav.).

Sliekų svoris ir reprodukcija 40 mg Pb/kg koncentracijoje buvo mažesni nei 1000 mg Pb/kg koncentracijoje, taigi nustatytos švino koncentracijos audiniuose tik patvirtina anksčiau darbe nustatytus ir analizuotus rezultatus (mažesnę sliekų svorį ir reprodukciją po poveikio 40 mg Pb/kg).



3.22 pav. Bioakumuliacija sliekų audiniuose po poveikio švinu ir po atsistatymo

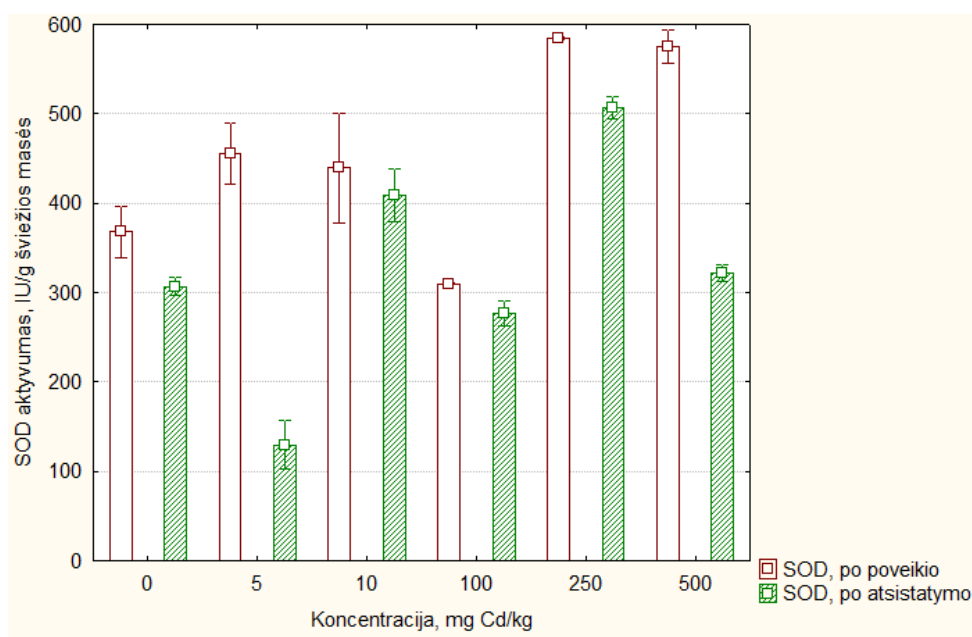
Iš 3.22 pav. pateiktų duomenų matyti, kad po 56 dienų atsistatymo švino koncentracija sliekų audiniuose sumažėjo, tačiau buvusiose 40 ir 1000 mg Pb/kg koncentracijose laikytų sliekų išliko didesnė lyginant su kontroline grupe (40 mg Pb/kg koncentracijoje sumažėjo 1,32 kartus, 1000 mg Pb/kg koncentracijoje sumažėjo 1,55 kartus). Po atsistatymo 1000 mg Pb/kg koncentracija veikti sliekai išlaikė mažesnę švino kiekį audiniuose nei sliekai prieš atsistatymą buvę 40 mg Pb/kg koncentracijoje.

Lyginant kadmio bioakumuliaciją audiniuose su švino bioakumuliacija nustatyta, kad kadmio buvo labiau biologiškai prieinamas sliekams ir sliekai po poveikio sukaupė didesnes kadmio koncentracijas nei sliekai veikti švinu. Be to, sliekai geriau pasisavino mažas metalų koncentracijas (5 mg Cd/kg ir 40 mg Pb/kg) nei dideles. Po atsistatymo sliekai poveikio laikotarpiu veikti kadmiumu išsivalė geriau nei veikti švinu, vadinasi kadmio buvo ne tik biologiškai geriau prieinamas sliekams, bet ir geriau pašalinamas. Tai galėjo lemti kadmio savybė indukuoti metalotioneinus, kurie detoksikuoja taršą. Priešingai nei kadmio, švinas nėra pripažintas kaip MT induktorius ir švino detoksikacija sliekuose sudarant MT ir švino kompleksus nėra nustatyta (Jones et al., 2009).

3.6. Kadmio poveikis kompostinio slieko (*Eisenia fetida*) biocheminiams rodikliams ir jų atsistatymas

Nustatyta, kad kadmio daro reikšmingą poveikį SOD fermentams, $F=3,85$, $p<0,05$. Po poveikio kadmiu visose koncentracijose, išskyrus 100 mg Cd/kg koncentraciją, sliekų fermentų aktyvumas buvo didesnis lyginant su kontroline grupe, bet tik 250 mg Cd/kg ir 500 mg Cd/kg nustatyti skirtumai buvo statistiškai reikšmingi ($p<0,05$) (3.23 pav.)

Didžiausias SOD aktyvumas nustatytas 250 mg Cd/kg ir 500 mg Cd/kg koncentracijose, jis buvo atitinkamai 1,59 ir 1,56 kartus statistiškai reikšmingai didesnis lyginant su kontroline grupe ($p<0,05$). Toks kitimas gali reikšti, kad sliekai geba kovoti su mažomis kadmio koncentracijomis, tačiau didelės kadmio koncentracijos sukelia didesnį oksidacinį stresą ir fermentai ypač suaktyvėja. 250 mg Cd/kg koncentracijoje fermentų aktyvumas šiek tiek didesnis nei didžiausioje koncentracijoje, tai galėjo lemti intensyvesnis H_2O_2 ir kitų ROS produktų formavimasis didžiausioje koncentracijoje.



3.23 pav. Sliekų *Eisenia fetida* SOD fermentų aktyvumas po poveikio skirtingomis kadmio koncentracijomis ir atsistatymo laikotarpiu

Iš 3.23 pav. pateiktų duomenų matome, jog atsistatymo laikotarpiu SOD aktyvumas sumažėjo visose buvusiose kadmio koncentracijose, tačiau nustatyta, kad buvusios kadmio koncentracijos turėjo reikšmingą poveikį SOD aktyvumui, $F=21,56$, $p<0,05$.

Lyginant poveikio laikotarpio SOD aktyvumą su atsistatymo laikotarpio SOD aktyvumu didžiausias pokytis nustatytas 5 mg Cd/kg koncentracijoje, aktyvumas buvo statistiškai reikšmingai 3,52 kartus mažesnis nei poveikio laikotarpiu ir buvo 2,37 kartus statistiškai reikšmingai mažesnis

lyginant su kontroline grupe ($p < 0,05$). Tai rodo, kad mažiausia kadmio koncentracija paveikti sliekai lengviau atsistato nei veikti didesnėmis koncentracijomis.

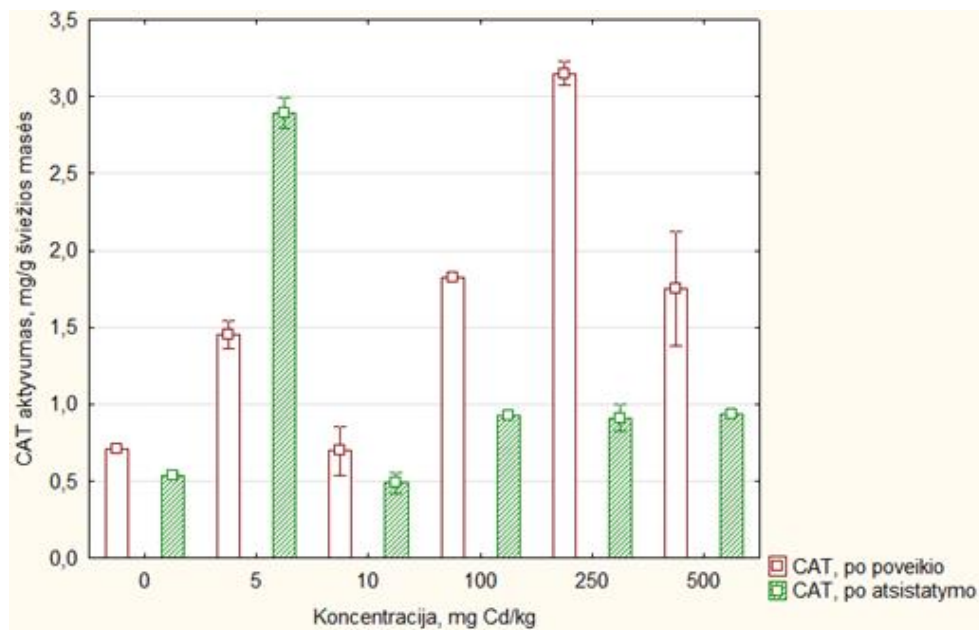
Po atsistatymo didžiausias fermentų aktyvumas kaip ir po poveikio nustatytas didžiausioje 250 mg Cd/kg koncentracijoje, tarp poveikio laikotarpio fermentų aktyvumo ir atsistatymo laikotarpio fermentų aktyvumo nustatytas statistiškai reikšmingas skirtumas ($p < 0,05$). Fermentų aktyvumas po atsistatymo buvo 1,65 kartus statistiškai reikšmingai didesnis lyginant su kontroline grupe ($p < 0,05$). Tai parodo, kad atsistatymo laikotarpiu 250 mg Cd/kg koncentracija vis dar neišvengiamai veikia sliekus ir antioksidaciniai fermentai kovoja su teršalu.

Panašūs rezultatai gauti S. C. Novais et al. (2011) tyrime, ten *Enchytraeus albidus* žieduotosios kirmėlės buvo veikiamos 0, 1, 5, 100 mg Cd/kg koncentracijomis. Nustatyta, kad eksperimento pabaigoje, t.y. po 8 dienų poveikio didėjant koncentracijai SOD aktyvumas didėjo, taigi kaip ir šiame eksperimente didėjant koncentracijai gynybinė arba kitaip - apsauginė sistema aktyvėjo.

Po 8 savaičių poveikio kadmiu buvo įvertintas CAT aktyvumas ir nustatyta, kad didėjančios kadmio koncentracijos daro statistiškai reikšmingą poveikį šiems fermentams, $F=25,02$, $p < 0,05$. Po poveikio kadmiu CAT aktyvumas sumažėjo tik 10 mg Cd/kg ir 500 mg Cd/kg koncentracijose, kitomis koncentracijomis veiktų sliekų CAT aktyvumas didėjo, tačiau lyginant su kontroline grupe tik tarp 5 mg Cd/kg ir 250 mg Cd/kg koncentracijose buvusių sliekų CAT aktyvumo nustatyti skirtumai buvo statistiškai reikšmingi ($p < 0,05$) (3.24 pav.).

Mažiausias CAT aktyvumas po poveikio nustatytas mažiausiose kadmio koncentracijose (5 ir 10 mg Cd/kg), paveiktų didesnėmis koncentracijomis sliekų CAT aktyvumas buvo žymiai didesnis, tai reiškia, kad didelėmis koncentracijomis veiktų sliekų CAT fermentai reagavo į taršą ir suaktyvėjo. Didžiausias CAT fermentų aktyvumas nustatytas sliekams paveiktiems 250 mg Cd/kg koncentracija, aktyvumas šioje koncentracijoje buvo 4,44 kartus statistiškai reikšmingai didesnis lyginant su kontroline grupe ($p < 0,05$). Paveiktų 500 mg Cd/kg koncentracija sliekų CAT aktyvumas lyginant su 250 mg Cd/kg koncentracijoje buvusiu aktyvumu sumažėjo, bet buvo didesnis nei kontrolinės grupės, nors skirtumai tarp vidurkių nėra statistiškai reikšmingi ($p > 0,05$).

X. Chen et al. (2017) tyrime ta pati sliekų rūšis *Eisenia fetida* 14 dienų buvo veikiami skirtingomis kadmio koncentracijomis (0; 0,1; 0,5; 1; 5; 10; 50; 100 mg Cd/kg). Buvo nustatytos labai panašios CAT kitimo tendencijos, veikiant vis didesnėmis kadmio koncentracijomis CAT aktyvumas didėja, o paveikus pačia didžiausia 100 mg Cd/kg koncentracija aktyvumas staigiai sumažėjo.



3.24 pav. Sliekų *Eisenia fetida* CAT fermentų aktyvumas po poveikio skirtingomis kadmio koncentracijomis ir atsistatymo laikotarpiu

Iš 3.24 pav. pateiktų duomenų matyti, kad po 8 savaičių atsistatymo CAT aktyvumas, sumažėjo visose buvusiose koncentracijose, išskyrus 5 mg Cd/kg, tačiau net po atsistatymo kadmio darė reikšmingą poveikį CAT fermentų veiklai, $F=153,70$, $p<0,05$.

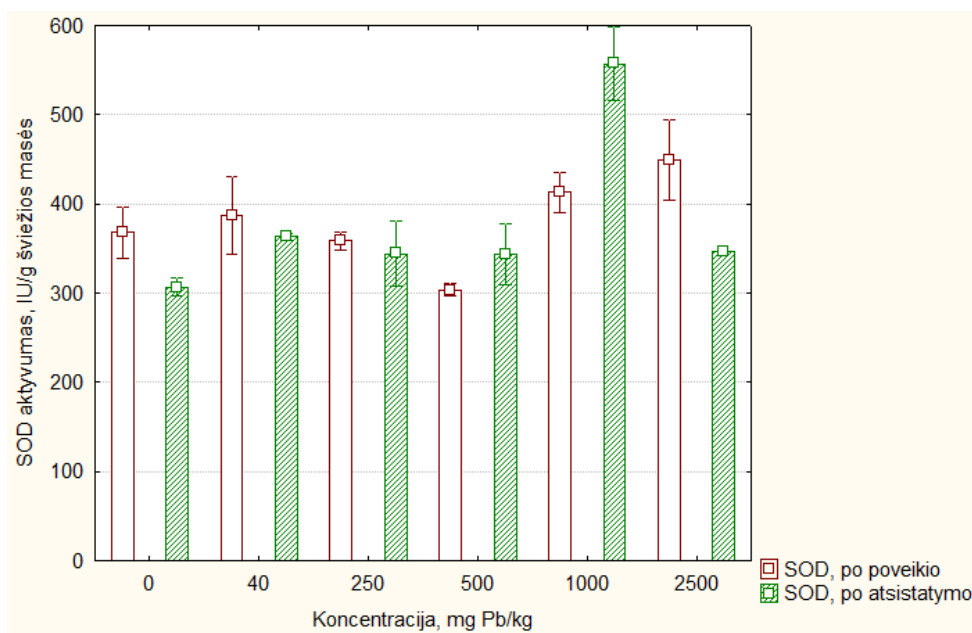
Nustatyta, kad 100-500 mg Cd/kg koncentracijomis veiktų sliekų atsistatymo laikotarpiu CAT aktyvumas buvo beveik vienodas ir visur statistiškai reikšmingai didesnis lyginant su kontroline grupe ($p<0,05$). Didžiausias CAT aktyvumo sumažėjimas po atsistatymo nustatytas buvusioje 250 mg Cd/kg koncentracijoje, lyginant fermentų aktyvumą po poveikio su atsistatymo laikotarpiu nustatytas statistiškai reikšmingas skirtumas (fermentų aktyvumas sumažėjo 3,46 kartus) ($p<0,05$). Toks CAT fermentų aktyvumo sumažėjimas atsistatymo laikotarpiu reiškia, kad pašalinus taršą kadmio sliekų gynybos sistema sulėtėja, tačiau negrįžta į normalią būseną.

Apibendrinant kadmio poveikį tirtiems antioksidaciniais fermentams pastebėta, kad didelėmis kadmio koncentracijomis veiktų sliekų SOD ir CAT fermentų aktyvumas yra žymiai didesnis nei veiktų mažomis koncentracijomis, o po atsistatymo CAT fermentai atsistato geriau nei SOD fermentai.

3.7. Švino poveikis kompostinio sliekų (*Eisenia fetida*) biocheminiams rodikliams ir jų atsistatymas

Nustatyta, kad švinas daro tik nežymų poveikį fermentams, $F=2,98$, $p<0,05$. Pastebėta, kad SOD fermentų aktyvumas veikiant 40-500 mg Pb/kg koncentracijomis mažėja, o paveikus 1000-2500 mg Pb/kg koncentracijomis SOD šiek tiek padidėja, tačiau lyginant su kontroline grupe statistiškai reikšmingas skirtumas nustatytas tik 500 mg Pb/kg koncentracijoje (3.25 pav.). Tad

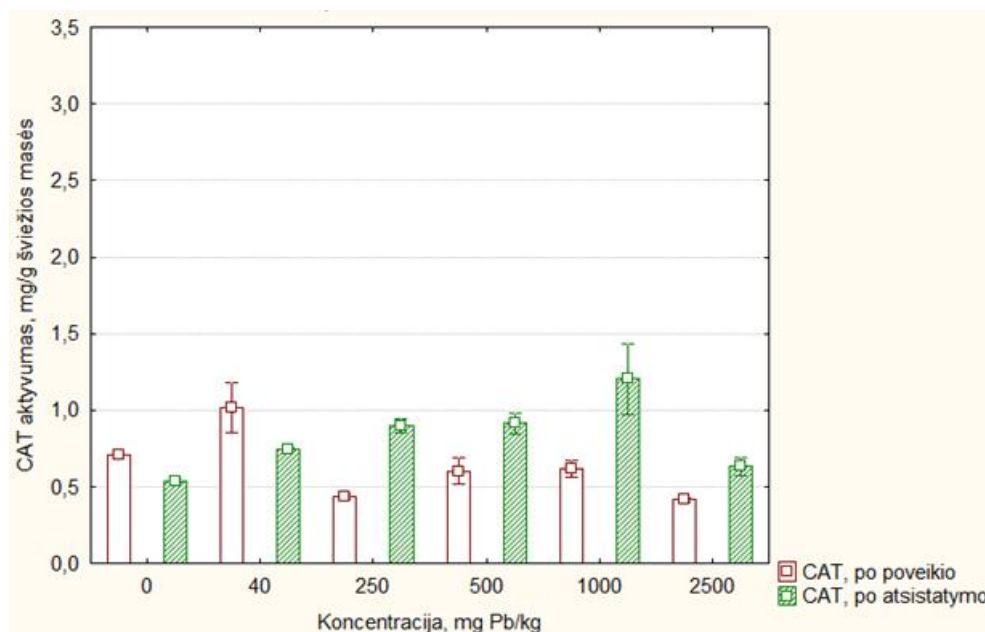
galima daryti išvadą, kad švinas, priešingai nei kadmis, nesukėlė oksidacinio streso ir fermentų sistema nesuaktyvėjo.



3.25 pav. Sliekų *Eisenia fetida* SOD fermentų aktyvumas po poveikio skirtingomis švino koncentracijomis ir atsistatymo laikotarpiu

Po perkėlimo į švinu neužterštus dirvožemius buvusios švino koncentracijos darė mažai reikšmingą poveikį SOD fermentų veiklai, $F=8,28$, $p<0,05$. Iš 3.25 pav. pateiktų duomenų matyti, kad po 8 savaičių atsistatymo SOD fermentų aktyvumas kito nežymiai ir buvo panašus į kontrolinės grupės. 1000 mg Pb/kg koncentracija paveikti sliekai po atsistatymo pasižymėjo didžiausiu SOD aktyvumu, kuris 1,82 kartus buvo statistiškai reikšmingai didesnis lyginant su kontroline grupe ir 1,35 kartus statistiškai reikšmingai didesnis nei po poveikio ($p<0,05$). SOD fermentų aktyvumo atsaistymą vertinti ir analizuoti plačiau nėra tikslinga, nes net po poveikio švinu fermentai nebuvo aktyvūs.

Po 8 savaičių poveikio švinu buvo įvertintas CAT aktyvumas ir nustatyta, kad didėjančios švino koncentracijos daro nežymų poveikį šioms fermentams, $F=5,37$, $p<0,05$. Vienintelių 40 mg Pb/kg koncentracija paveiktų sliekų SOD aktyvumas, buvo didesnis nei kontrolinės grupės, tačiau skirtumas nebuvo statistiškai reikšmingas ($p>0,05$). Taigi tai įrodo, kad švinas nesuaktyvino CAT fermentų gynybinės sistemos (3.26 pav.).



3.26 pav. Sliekų *Eisenia fetida* CAT fermentų aktyvumas po poveikio skirtingomis švino koncentracijomis ir atsistatymo laikotarpiu

Po atsistatymo CAT fermentų aktyvumas išliko artimas poveikio laikotarpio fermentų aktyvumui. Tad jei po poveikio švinu CAT fermentai, kaip ir SOD, nesuaktyvėjo tai analizuoti fermentų atsistatymą net nėra tikslinga.

Apibendrinant galima teigti, kad švinas nesukėlė antioksidacinių fermentų aktyvumo nei poveikio nei atsistatymo laikotarpiu. Tai parodo, kad sliekai nepatyrė oksidacinio streso ir švinas buvo mažiau toksiškas fermentams lyginant su kadmiumu.

IŠVADOS

1. Kadmio ir švino neigiamai veikė sliekų išgyvenamumą, didėjant metalų koncentracijai ir ilgėjant poveikio laikui sliekų išgyvenamumas mažėjo (veikiant kadmio po 14 dienų $R^2=0,38$; po 28 dienų $R^2=0,38$; po 42 dienų $R^2=0,36$; po 56 dienų $R^2=0,32$ ($p<0,05$); veikiant švinu po 14 dienų $R^2=0,69$; po 28 dienų $R^2=0,71$; po 42 dienų $R^2=0,62$; po 56 dienų $R^2=0,71$, ($p<0,05$)). Mažos kadmio koncentracijos (10 ir 100 mg Cd/kg) nesukėlė sliekų svorio mažėjimo, tačiau veikiant 250 ir 500 mg Cd/kg koncentracijomis sliekų svoris mažėjo. Vertinant švino poveikį sliekų augimui nustatyta, kad veikiant visomis švino koncentracijomis, išskyrus mažiausią (40 mg Pb/kg) sliekų svoris augo. Abu tirti metalai neigiamai veikė reprodukciją, veikiant visomis kadmio ir švino koncentracijomis kokonų ir jauniklių skaičius buvo statistiškai reikšmingai mažesnis lyginant su kontroline grupe ($p<0,05$). Kenksmingiausios reprodukcijai buvo didžiausios kadmio (250 ir 500 mg Cd/kg) ir didžiausia švino (2500 mg Pb/kg) koncentracijos.

2. Vertinant sliekų išgyvenamumą atsistatymo laikotarpiu nustatyta, kad buvusios švino koncentracijos nedarė neigiamo poveikio išgyvenamumui atsistatymo laikotarpiu, o buvusios kadmio koncentracijos turėjo įtakos tik atsistatymo pradžioje (pirmas 14 dienų), vėliau mirtingumas neužfiksuotas. Sliekų svoris atsistatymo laikotarpiu geriausiai augo buvusiose didžiausiose (250 ir 500 mg Cd/kg) kadmio ir buvusioje mažiausioje (40 mg Pb/kg) švino koncentracijose, tačiau sliekų svoris išliko statistiškai reikšmingai mažesnis lyginant su kontroline grupe ($p<0,05$). Nors po atsistatymo laikotarpio kokonų ir jauniklių skaičius buvo statistiškai reikšmingai didesnis nei po poveikio metalais laikotarpio, tačiau buvusios metalų koncentracijos neigiamai veikė reprodukciją ir kokonų bei jauniklių skaičius kontrolinės grupės lygio nepasiekė.

3. Vertinant kadmio poveikį sliekų SOD fermentams nustatyta, kad veikiant visomis kadmio koncentracijomis, išskyrus 100 mg Cd/kg, sliekų SOD fermentų aktyvumas buvo didesnis, lyginant su kontroline grupe. Didžiausias SOD fermentų aktyvumas nustatytas sliekams paveiktiems didžiausiomis kadmio 250 mg Cd/kg ir 500 mg Cd/kg koncentracijomis ($p<0,05$). Vertinant kadmio įtaką CAT fermentams nustatyta, kad veikiant visomis kadmio koncentracijomis, išskyrus 10 mg Cd/kg, CAT fermentų aktyvumas buvo didesnis lyginant su kontroline grupe. Abiejų antioksidacinių fermentų suaktyvėjimas parodo, kad sliekų gynybinė sistema reagavo į taršą ir kovojo su oksidaciniu stresu. Švinas darė nežymų poveikį SOD ir CAT fermentų aktyvumui. Fermentų aktyvumas visose švino koncentracijose buvo artimas kontrolinės grupės SOD ir CAT aktyvumui. Taigi, lyginant kadmio ir švino poveikį fermentams pastebėta, kad švinas yra mažiau toksiškas antioksidaciniams fermentams lyginant su kadmio ir oksidacinio streso nesukelia.

4. Stebint SOD ir CAT fermentų aktyvumą po atsistatymo periodo nustatyta, kad beveik visomis buvusiomis kadmio koncentracijomis veiktų sliekų fermentų aktyvumas sumažėjo, tačiau

buvusios kadmio ir švino koncentracijos turėjo reikšmingą poveikį SOD ir CAT fermentų aktyvumui. Mažomis kadmio koncentracijomis veiktų sliekų SOD fermentai atsistatė lengviau nei veiktų didelėmis kadmio koncentracijomis. Didžiausias CAT aktyvumo sumažėjimas po atsistatymo nustatytas buvusioje 250 mg Cd/kg koncentracijoje, lyginant fermentų aktyvumą po poveikio su atsistatymo laikotarpiu nustatytas statistiškai reikšmingas skirtumas ($p < 0,05$). Poveikio laikotarpiu švinas nesukėlė žymaus fermentų aktyvumo padidėjimo, taigi ir po 56 dienų atsistatymo SOD fermentų aktyvumas kito nežymiai ir buvo panašus į kontrolinės grupės fermentų aktyvumą. CAT fermentams atsistatymo metu švinas įtakos nedarė, nes poveikio laikotarpiu oksidacinis stresas nebuvo sukeltas.

5. Lyginant kadmio ir švino toksiškumą sliekų fiziologiniams rodikliams galima teigti, kad abu metalai vienodai neigiamai paveikė išgyvenamumą ir reprodukciją. Sliekų svorio mažėjimas buvo intensyvesnis veikiant kadmiu. Vertinant sliekų atsistatymą nustatyta, kad sliekų išgyvenamumui įtakos atsistatymo laikotarpiu turėjo tik kadmio, švinas neigiamo poveikio išgyvenamumui nedarė. Abu metalai neigiamai paveikė sliekų svorį ir reprodukciją atsistatymo laikotarpiu ir nors sliekų svoris augo, o reprodukcija intensyvėjo, tačiau iki kontrolinės grupės lygio neatsistatė. Lyginant kadmio ir švino toksiškumą biocheminiams rodikliams galima teigti, kad kadmio buvo toksiškesnis sliekų antioksidaciniams fermentams, lyginant su švinu. Veikiant kadmiu fermentai reagavo į taršą ir intensyvėjo, o veikiant švinu išliko mažai aktyvūs. Po atsistatymo periodo sliekų fermentų aktyvumui įtakos turėjo tik buvusios kadmio koncentracijos, vadinasi kadmio išliko toksiškesnis lyginant su švinu.

LITERATŪRA

1. **Adomaitis T., Mažvila J., Eitminavičius L.** 2003. A comparative study of heavy metals in the soils of cities and arable lands. *Ekologija*, Nr. 3, Vilnius.
2. **Ali N. A., Ater M., Sunahara G. I., Robidoux P. Y.** 2004. Phytotoxicity and bioaccumulation of copper and chromium using barley (*Hordeum vulgare* L.) in spiked artificial and natural forest soils. *Ecotoxicology and Environmental Safety* Nr. 57, p. 363–374
3. **An Y. O., Kim Y. M., Kwon T. I., Jeong S. W.** 2004. Combined effect of copper, cadmium, and lead upon *Cucumis sativus* growth and bioaccumulation. *Science of the Total Environment*. Nr. 326, p. 85-93.
4. **Ashauer R., O'Connor I., Hintermeister A., Escher B. I.** 2015. Death Dilemma and Organism Recovery in Ecotoxicology. *Environmental Science Technology*. Nr. 49 (16), p. 10136–10146.
5. **Bergkvist P., Jarvis N., Berggren D., Carlgren K.** 2003. Long-term effects of sewage sludge applications on soil properties, cadmium availability and distribution in arable soil. *Agriculture, Ecosystems and Environment* Nr. 97, p. 167–179.
6. **Bradl H. B.** 2005. Heavy metals in the environment: origin, interaction and remediation. Germany: University of applied sciences trier Neubrucke. 269 p.
7. **Briat J. F., Lebrun M.** 1999. Plant responses to metal toxicity. Nr. 322, p. 43-54.
8. **Chen X., Wang X., Gu X., Jiang Y., Ji R.** 2017. Oxidative stress responses and insights into the sensitivity of the earthworms *Metaphire guillelmi* and *Eisenia fetida* to soil cadmium. Nr. 574, p. 300-306.
9. **Cheng H., Hu Y.** 2010. Lead (Pb) isotopic fingerprinting and its applications in lead pollution studies in China: A review. *Environmental Pollution*. Nr. 158, p. 1134-1146.
10. **Chonga S. J. F., Lova I. I. C., Pervaiz S.** 2014. Mitochondrial ROS and involvement of Bcl-2 as a mitochondrial ROS regulator. *Mitochondrion*. Nr. 19, p. 39–48.
11. **Conder J. M., Lanno RP.** 2000. Evaluation of surrogate measures of cadmium, lead, and zinc bioavailability to *Eisenia fetida*. *Chemosphere*, Nr. 41(10):1659-68.
12. **Didžiapetrienė J., Uleckienė S., Griciūtė L. L., Valuckas K. P., Atkočius V., Kadziauskas J.** 2004. Antioksidantai onkologijoje. Nauda ir vartojimo rizika: monografija. Vilnius: Lietuvos mokslas, 153 p.
13. **Doull J., Klaassen CD.** 1980 Cassarett and Doull's Toxicology. Macmillan, New York.
14. **Dube A., Zbytniewski R., Kowalkowski T., Cukrowska E., Buszewski B.** 2001. Adsorption and migration of heavy metals in soil. *Polish Journal of Environmental Studies*, Nr. 10.

15. **Eijsackers H.** 2001. Earthworms as colonizers of natural and cultivated soil environments. *Applied Soil Ecology*. Nr. 50, p. 1-13.
16. **Eitminavičiūtė I., Strazdienė V., Bagdonavičienė Z., Matusevičiūtė A., Gilytė B.** 2002. Kadmio poveikis zoocenozėms nuotėkų dumblo komposte. Nr. 3 (Vilnius), *Ekologija*.
17. **Espín S., Martínez-López E., León-Orteg M., Martínez J. E., García-Fernández A. J.** 2014. Oxidative stress biomarkers in Eurasian eagle owls (*Bubo bubo*) in three different scenarios of heavy metal exposure. *Environmental Research*. Nr. 131, p. 134-144.
18. **Fadaee R.** 2012. A review on earthworm *Eisenia fetida* and its applications. *Annals of Biological Research*. Nr. 3 (5), p. 2500-2506.
19. **Galunina E., Ferretia J., Zapelinia, I., Vieiraa I., Tarleya C. R. T., Abrãob T., Santosa M. J.** 2014. Cadmium mobility in sediments and soils from a coal mining area on Tibagi River watershed: Environmental risk assessment. *Journal of Hazardous Materials*. Nr. 265, p. 280–287.
20. **Gestel C. A. M., Dirven-van Breemen E. M., Baerselman R.** 1993. Accumulation and elimination of cadmium, chromium and zinc and effects on growth and reproduction in *Eisenia andrei* (Oligochaeta, Annelida). *The Science of the Total Environment*. Nr. 134, p. 585-597.
21. **Gutiérrez C., Fernández C., Escuer M., Campos-Herrera R., Rodríguez M. E. B., Carbonell G., Martín J. A. R.,** 2016. Effect of soil properties, heavy metals and emerging contaminants in the soil nematodes diversity. *Environmental Pollution*. Nr. 213, p. 184-194.
22. **Heikens A., Peijnenburg W. J. G. M., Hendriks A. J.** 2001. Bioaccumulation of heavy metals in terrestrial invertebrates. *Environmental pollution*, Nr.113, p. 385-393.
23. **Yan J., Quan G., Ding C.** 2013. Effects of the combined pollution of lead and cadmium on soil urease activity and nitrification. *Procedia Environmental Sciences*. Nr. 18, p. 78 – 83
24. **Yang X., Songa Y., Kai J., Cao X.** 2012. Enzymatic biomarkers of earthworms *Eisenia fetida* in response to individual and combined cadmium and pyrene. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. Nr. 86, p. 162-167.
25. **Javeda M., Ahmad I., Usmania N., Ahmad M.** 2016. Studies on biomarkers of oxidative stress and associated genotoxicity and histopathology in *Channa punctatus* from heavy metal polluted canal. Nr. 1515, p. 210–219.
26. **Jones D. P.** 2008. Radical-free biology of oxidative stress. *Am J Physiol Cell Physiol* Nr. 295, p. 849-C868.
27. **Jones R. P., Bednar A. J., Inouye L. S.** 2009. Subcellular compartmentalization of lead in the earthworm, *Eisenia fetida*: Relationship to survival and reproduction. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. Nr. 72, p. 1045–1052.

28. **Jung M. C.** 2008. Heavy Metal Concentrations in Soils and Factors Affecting Metal Uptake by Plants in the Vicinity of a Korean Cu-W Mine. Nr. 8, 2413-2423.
29. **Kattwinke M., Römbke J., Liess M.** 2012. Ecological recovery of populations of vulnerable species driving the risk assessment of pesticides. External scientific report. p. 98.
30. **Kohen R, Nyska A.** 2002. Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. Toxicol Pathol Nr. 30, p. 620-50.
31. **Kumar S. K., Dahms H. U., Won E. J., Lee J. S., Shina K. H.** 2015. Microalgae – A promising tool for heavy metal remediation. Ecotoxicology and Environmental Safety. Nr. (113), p. 329–352.
32. **Kurian R., Velmourougane K.** 2011 Chemical and microbiological changes during vermicomposting of coffee pulp using exotic (*Eudrilus eugeniae*) and native earthworm *Perionyx ceylanesis* species." Biodegradation. Nr. 22, p. 497-507.
33. **Li L. Z., Zhou D. M., Peijnenburg W. J. G. M., Wang P., Gestel C. A. M., Jin S. Y., Wang q. Y.** 2010. Uptake pathways and toxicity of Cd and Zn in the earthworm *Eisenia fetida*. Soil Biology and Biochemistry. Nr. 42, p. 1045–1050.
34. **Li L., Xu Z., Wu J., Tian G.** 2010. Bioaccumulation of heavy metals in the earthworm *Eisenia fetida* in relation to bioavailable metal concentrations in pig manure. Nr. 101, p. 3430-3436.
35. **Lietuvos higienos norma HN 60:2004.** Pavojingų cheminių medžiagų didžiausios leistinos koncentracijos dirvožemyje.
36. **Liu F., Zhu P., Xue J.** 2012. Comparative Study on Physical and Chemical Characteristics of Sludge Vermicomposted by *Eisenia Fetida*. Nr. 16. p. 418-423.
37. **Lemtiri A., Liénard A., Alabi T., Brostaux Y., Cluzeau D., Francis F., Colinet G.** 2016. Earthworms *Eisenia fetida* affect the uptake of heavy metals by plants *Vicia faba* and *Zea mays* in metal-contaminated soils. Applied Soil Ecology. Nr. 104. p. 67-78.
38. **Lepetsos P., Papavassiliou A. G.** 2016. ROS/oxidative stress signaling in osteoarthritis. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease. Volume 1862, Issue 4, Pages 576–591.
39. **Luo W., Verweij A. R., Gestel van A. M.** 2014. Determining the bioavailability and toxicity of lead contamination to earthworms requires using a combination of physicochemical and biological methods. Environmental Pollution. Nr. 185, p. 1-9.
40. **Mahar A., Wang P., Ali A., Awasthi M. K., Lahori A. H., Wang Q., Li R., Zhang Z.** 2016. Challenges and opportunities in the phytoremediation of heavy metals contaminated soils: A review. Ecotoxicology and Environmental Safety. Nr. 126, p. 111-121.

41. **Maity S., Roy S., Chaudhury S., Bhattachary S.** 2007. Antioxidant responses of the earthworm *Lampito mauritii* exposed to Pb and Zn contaminated soil. *Environmental Pollution*. Nr. 151, p. 1-7.
42. **Maity S., Roy S., Chaudhury S., Bhattacharya S.** 2008. Antioxidant responses of the earthworm *Lampito mauritii* exposed to Pb and Zn contaminated soil. *Environmental Pollution*. Nr. 151, p. 1-7.
43. **Maleri R. A., Reinecke A. J., Reinecke S. A.** 2008. Metal uptake of two ecophysiologically different earthworms (*Eisenia fetida* and *Aporrectodea caliginosa*) exposed to ultramafic soils. *Applied Soil Ecology*. Nr. 38, p. 42-50.
44. **Margaritelis N. V., Cogley J. N., Paschalis V., Veskoukis A. S., Theodorou A. A., Kyparos A., Nikolaidis M. G.** 2016. Going retro: Oxidative stress biomarkers in modern redox biology. *Free Radical Biology and Medicine*.
45. **Mažvila J., Adomaitis T. ir kt.** 2001. Sunkieji metalai Lietuvos dirvožemiuose ir augaluose. Iš: *Žemdirbystė: mokslo darbai*. LŽI, T. 73, P. 64 – 90.
46. **Meral A, Tuncel P, Surmen-Gur E, Ozbek R, Ozturk E, Gunay U.** 2000 Lipid peroxidation and antioxidant status in beta-thalassemia. *Pediatr Hematol Oncol* Nr. 17, p. 687-93.
47. **Moreau-Valancogne P., Bertrand M., Holmstrup M., Roger-Estrade J.** 2013. Integration of thermal time and hydrottime models to describe the development and growth of temperate earthworms. *Soil Biology and Biochemistry*. Nr. 63. p. 50-60.
48. **Morgan A. J., Stürzenbaum S. R., Minters C., Kille P.** 1999. Cellular and molecular aspects of metal sequestration and toxicity in earthworms. *Invertebrate Reproduction and Development*, 36, p. 17 – 24
49. **Neuhauser E. F., Loehr R. C., Milligan D. L. and Malecki M. R.** 1985. Toxicity of metals to the earthworm *Eisenia fetida*. *Biology and Fertility of Soils*, p. 149-152.
50. **Novais S. C., Gomes S. I. L., Gravato C., Guilhermino L., Coen W.D., Soares A. M. V. M., Amorim M. J. B.** 2011. Reproduction and biochemical responses in *Enchytraeus albitus* (Oligochaeta) to zinc or cadmium exposures. *Environmental Pollution*. Nr. 159, p. 1836-1843.
51. **OECD 222. Guideline for the testing of chemicals.** 2004. Earthworm reproduction test (*Eisenia fetida/Eisenia adrei*), acute toxicity tests, Guideline for testing of chemicals 222. 18 p.
52. **Olajire A. A., Ayodele E. T., Oyedirdan G. O., Oluyemi E. A.** 2003 Levels and speciation of heavy metals in soils of industrial southern Nigeria. *Environmental Monitoring and Assessment*, v.85, p.135-155.
53. **Otitoloju A. A.** 2002. Relevance of joint action toxicity evaluations in setting realistic environmental safe limits of heavy metals. *Journal of Environmental Management* Nr. 67, p. 121–128.

54. **Panzarino O., Hyršl P., Dobeš P., Vojtek L., Vernile P., Bari G., Terzano R., Spagnuolo M., Lilloa E.** 2015. Rank-based biomarker index to assess cadmium ecotoxicity on the earthworm *Eisenia anderei*. Chemosphere. Nr. 145, p. 480-486.
55. **Pen-Mouratova S., Shukurovb N., Steinbergera Y.** 2008. Influence of industrial heavy metal pollution on soil free-living nematode population. Environmental Pollution. Nr. 152, p. 172–183.
56. **Rault M., Collange B., Mazzia C., Capowiez Y.** 2008. Dynamics of acetylcholinesterase activity recovery in two earthworm species following exposure to ethyl-parathion. Soil Biology and Biochemistry. Nr. 40, p. 3086–3091.
57. **Regoli F., Gorbi S., Fattorini D., Tedesco S., Notti A., Machella N., Bocchetti R., Benedetti M., Piva F.** 2006. Use of the land snail *Helix aspersa* as sentinel organism for monitoring ecotoxicologic effects of urban pollution: an integrated approach. Environ Health Perspect. Nr. 114, p. 63-9.
58. **Ribera D., Narbonne J. F., Arnaud C., Saint-Denis M.** 2001. Biochemical responses of the earthworm *Eisenia fetida andrei* exposed to contaminated artificial soil, effects of carbaryl. Soil Biol. Biochem., Nr. 33, p. 1123–1130.
59. **Saint-Denis M., Narbonne J. F., Arnaud C., Thybaud E., Ribera D.** 1999. Biochemical responses of the earthworm *Eisenia fetida andrei* exposed to contaminated artificial soil: effects of benzo(a)pyrene Soil Biol. Biochem. Nr. 31, p. 1837–1846.
60. **Saint-Denisa M, Narbonneb J. F, Arnaudb C., Riberaa D.** 2001. Biochemical responses of the earthworm *Eisenia fetida andrei* exposed to contaminated artificial soil: effects of lead acetate. Soil Biology and Biochemistry. Nr. 33, p. 395–404.
61. **Santoyo M. M., Flores C. R., Torres A. L., Wrobel K, Wrobel K.** 2011. Global DNA methylation in earthworms: A candidate biomarker of epigenetic risks related to the presence of metals/metalloids in terrestrial environments. Environmental Pollution. Nr. 159, p. 2387–2392.
62. **Schmitt F. J., Renger G., Friedrich T., Kreslavski V. D., Zharmukhamedov S.K., Losc D. A., Kuznetsov V. V., Allakhverdiev S. I.** 2014. Reactive oxygen species: Re-evaluation of generation, monitoring and role in stress-signaling in phototrophic organisms. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Bioenergetics. Nr.1837, Issue 6, p. 835–848.
63. **Silveira M. L. A., Alleoni L. R. F., Guilherme L. R. G.** 2003. Biosolids and heavy metals in soils. Scientia Agricola, Nr.4
64. **Smith B. A., Egeler P., Gilberg D., Hendershot W., Stephenson GL.** 2010. Uptake and elimination of cadmium and zinc by *Eisenia andrei* during exposure to low concentrations in artificial soil. Arch Environ Contam Toxicol. Nr. 59, Issue 2, p. 264-273.

65. **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*. Nr. 84, p. 123-130.
66. **Spurgeon D. J., Svendsen C., Kille P., Morgan A. J., Weeks J. M.** 2004. Responses of earthworms (*Lumbricus rubellus*) to copper and cadmium as determined by measurement of juvenile traits in a specifically designed test system. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. Nr. 57, p. 54-64.
67. **Velki M., Hackenberger B. K.** 2013. Inhibition and recovery of molecular biomarkers of earthworm *Eisenia andrei* after exposure to organophosphate dimethoate. *Soil Biology and Biochemistry*. Nr. 57. p. 100-108.
68. **Vlahović M., Ilijin L., Mrdaković M., Todorović D., Matić D., Lazarević J., Mataruga V. P.** 2016. Glutathione S-transferase in the midgut tissue of gypsy moth (*Lymantria dispar*) caterpillars exposed to dietary cadmium. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. Nr. 44, p. 13-17.
69. **Wu S., Wu E., Qiu L., Zhong W., Chen J.** 2010. Effects of phenanthrene on the mortality, growth, and anti-oxidant system of earthworms (*Eisenia fetida*) under laboratory conditions. *Chemosphere*. Nr. 83, p. 429–434.
70. **Zhang W., Liu K., Li J., Chen L., Lin K.** 2015. Uptake and depuration kinetics of lead (Pb) and biomarker responses in the earthworm *Eisenia fetida* after simultaneous exposure to decabromodiphenyl ether (BDE209) *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, Nr.113, p. 45–51.
71. **Žaltauskaitė J., Sodienė I.** 2014. Effects of cadmium and lead on the life-cycle parameters of juvenile earthworm *Eisenia fetida*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. Nr. 103, p. 9-16.