

## Сравнение ремедиационных эффектов Биочара и Лигногумата на почвы при полиметаллическом загрязнении

© 2016. М. А. Пукальчик<sup>1</sup>, к.б.н., н.с., В. А. Терехова<sup>2,3</sup>, д.б.н., зав. лабораторией, О. С. Якименко<sup>1</sup>, к.б.н., с.н.с., М. И. Акулова<sup>1,2</sup>, аспирант,

<sup>1</sup>Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова, 119991, Россия, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12,

<sup>2</sup>Институт проблем экологии и эволюции им. А. Н. Северцова РАН, 119071, Россия, г. Москва, Ленинский проспект, д. 33,

<sup>3</sup>Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н. И. Пирогова, 117997, Россия, г. Москва, Островитянова, д. 1, e-mail: pukalchik.maria@gmail.com, letar.msu@gmail.com

Проведена оценка влияния двух мелиорантов (Биочара и Лигногумата) на почву, загрязнённую тяжёлыми металлами. В опытах через 3, 10 и 30 суток после внесения препаратов оценивали рН почв, динамику подвижных форм катионов Cd<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Pb<sup>2+</sup> и токсичность образцов по выживаемости червей *Eisenia fetida*. Результаты показали, что значения рН<sub>CaCl2</sub> почв повышались при внесении мелиорантов в количестве 0,5% и более. Одновременно в более щелочной почве значительно уменьшалась подвижность Pb и в меньшей степени Cd и Zn. Степень изменений химико-физических показателей зависела как от типа мелиоранта, его концентрации, так и срока экспозиции. Варианты, содержащие 0,05% Биочара и Лигногумата, не отличались от контроля, в то время как в вариантах, содержащих более 0,5% препаратов, наблюдали снижение концентрации подвижных форм Cd, Zn, Pb. Наибольший эффект иммобилизации достигнут при внесении 5% Биочара на 30-е сутки – наблюдалось снижение доли подвижных форм Pb на 60%, Zn на 20%, Cd на 35%. Внесение 1% Лигногумата снизило подвижность Pb на 53%, Zn на 14%, Cd на 30%. Результаты статистической обработки данных методом главных компонент выявили, что влияние дозы мелиорантов на концентрацию подвижных форм тяжёлых металлов статистически значимо для 2/3 проанализированных проб и составляет до 69,9% наблюдаемой суммарной дисперсии. При биотестировании проб почв, обработанных Биочаром, наблюдалась существенная гибель червей уже в первые сроки наблюдений, что, возможно, связано с изменением структуры почвы и нарушением пористости. В то время как Лигногумат значительно нивелировал токсическое действие тяжёлых металлов на червей *Eisenia fetida*.

Ключевые слова: тяжёлые металлы, мелиоранты, биотестирование, гуминовые вещества, качество почв, *Eisenia fetida*.

## Evaluation of biochar and lignogumate remediation effect in heavy metal-contaminated soil

M. A. Pukalchik<sup>1</sup>, V. A. Terekhova<sup>2,3</sup>, O. S. Yakimenko<sup>1</sup>, M. I. Akulova<sup>1,2</sup>,

<sup>1</sup>Lomonosov MSU,

1-12 Leninskie Gory, Moscow, Russia, 119991,

<sup>2</sup>Institute of Ecological and Evolutional Issues named after A.N. Severtsov RAS,

33 Leninskiy pr., Moscow, Russia, 119071,

<sup>3</sup>Russian national research medical University named after N.I. Pirogov,

1 Ostrovitianov st., Moscow, Russia, 117997,

e-mail: pukalchik.maria@gmail.com, letar.msu@gmail.com

Heavy metals (HM) are considered priority pollutants of environmental concern. There are several technologies of remediating HM-polluted soil using amendments produced from natural sources which is becoming more popular for remediation purposes. This paper focuses on chemical and ecotoxicological influence of Biochar (BC) and Lignohumate (LG) onto heavily-contaminated fluviosoil. A greenhouse pot experiment has been carried out for 30 days. Soils were treated with two different types and three levels of amendments (0.05, 0.5 and 5% for BC and 0.05, 0.5 and 1% for LG) according to the final soil pH(CaCl<sub>2</sub>) rate: 6.0, 6.5 and 7.0. Samples were collected after three time-term treatments (3, 10 and 30 days). Results revealed that 0.5–5% BC and 0.5–1% LG treatments significantly reduced active lead, zinc and cadmium concentrations, probably due to formation of metal-organic complexes. Higher survival rate of *E.fetida* in soil with all LG treatments indicated that remediation measures improved soil quality. However, BC treatments had a detrimental effect in soil toxicity, induced earthworms mortality in high concentration (up to 100% after 3 days). The

results showed that the bioassay data from the treated variants did not supposedly reflect decrease in Pb, Zn and Cd concentrations in soil, but depended on some amendments' properties. It suggests that bioassays are necessary to assess ecotoxicity of soil in case of remediation study with novel amendments.

**Keywords:** heavy metals, amendments, bioassay, humic substances, soil quality, *Eisenia fetida*.

## Введение

Загрязнение почв тяжёлыми металлами (ТМ) подавляет микробиологические и биохимические процессы, вызывает изменение структуры биоценозов, активности и направленности почвообразовательных процессов. При этом естественное самоочищение почв от повышенных концентраций тяжёлых металлов – длительный процесс.

Среди методов ремедиации почв *in situ* особую популярность в последние годы приобрели гуминовые препараты [1] и Биочар [2, 3], содержащие высокое количество углерода, а также характеризующиеся, как правило, высокой сорбционной ёмкостью и значительной площадью поверхности, что позволяет им активно связывать ТМ и иные поллютанты в почвах.

Оценка ремедиационной активности таких препаратов только на основе данных химических испытаний не является надёжным доказательством их «положительного» воздействия, так как химические тесты не отражают всех связей между загрязняющими веществами, почвой и живыми организмами, обитающими в ней. Как показано в опубликованных работах, подобные препараты практически никогда не остаются в почвенных средах инертными. При внесении в почвы они не только снижают концентрации токсичных и потенциально токсичных веществ, но и способны изменять базовые физические показатели почв [4–7], а также экотоксикологические показатели [8–14].

**Цель исследования** – оценка ремедиационных эффектов Биочара (BC) и гуминового препарата Лигногумата (LG) при полиметаллическом загрязнении почв.

## Материалы и методы

**Материалы.** Для проведения инкубационного эксперимента в ноябре 2015 г. были

отобраны аллювиальные почвы в районе реки Литавка, Прибрам, Чешская Республика (49°43'N, 14°0'E). Детальное описание этого участка, включая карту местности, опубликовано в работе [15]. Почвы в пойме этой реки характеризуются полиметаллическим загрязнением, в частности, экстремально высокими концентрациями катионов свинца, кадмия и цинка.

Исследование проводили на смешанном образце почвы (массой около 60 кг), который получен был методом «квартования» почвенной массы (примерно 200 кг), собранной с площади 10 м<sup>2</sup> (горизонт 0–20 см). Почву просушили в течение трёх дней на воздухе и просеяли (d=1 мм). Перед постановкой эксперимента почва характеризовалась как суглинистая, рН<sub>CaCl2</sub>=6,0±0,1, ЕКО=157 ммоль/кг, валовый состав: С<sub>орг</sub>=3,2±0,1%, Р=0,09±0,01%, К=0,60±0,08%, Mg=0,16±0,00%, Ca=0,18±0,01%, S=0,07±0,01%, Fe=3,4±0,01%, Mn=0,30±0,01%, Zn=521±21 мг/кг, Cd=127,4±3,6 мг/кг, Cr=3,3±1,0 мг/кг, Cu=5,7±1,6 мг/кг, Pb=3035±26 мг/кг.

**Биочар (BC)** для исследований предоставлен компанией Erspol., Ltd. (Czech Republic), произведён из кокосовой скорлупы при 600 °С, активная площадь поверхности 486 м<sup>2</sup>/г (подробное описание препарата приведено в статье [16]).

**Лигногумат (LG)** получен в ходе искусственной гумификации лигносульфоната и предоставлен компанией НПО «РЭТ» (Россия).

Некоторые общие показатели мелиорантов, полученные нами в результате анализа их компонентного состава, приведены в таблице 1.

**Инкубационный эксперимент.** Эксперимент проводился в двух параллельных сериях: 1) для анализа динамики химических показателей подготовили инкубационные сосуды, в которые помещали по 200 г воздушно-сухой почвы; 2) для оценки токсичности по реакции дождевых червей *E. fetida* подготовили алюми-

Некоторые свойства мелиорантов

Таблица 1

Мелиорант	Компонентный состав						
	N, %	C, %	H, %	S, %	C/N	Зола, %	pH <sub>CaCl2</sub>
Биочар (BC)	0,44	88,2	0,82	0,19	21,4	12,3	8,9
Лигногумат (LG)	0,25	33,47	3,72	4,84	134,7	40,0	9,0

Таблица 2

Доза внесения мелиорантов в образцы почв, вес %

Мелиорант	Ожидаемый уровень $pH_{CaCl_2}$ в образце		
	6,0±0,1	6,5±0,2	7,0±0,2
BC	0,05	0,5	5
LG	0,05	0,5	1

ниевые боксы, в которые помещали по 500 г воздушно-сухой почвы. Это позволило исключить влияние биоаккумуляции ТМ в теле червей [17], а также их влияния на концентрацию подвижных форм ТМ в почвах [18].

В каждую серию проб вносили мелиорант в сухом виде, согласно схеме эксперимента, (табл. 2) и тщательно перемешивали. Для корректного сравнения результатов эксперимента препараты вносили в количествах, эквивалентных изменению  $pH$  почвенной среды на 0,5 отн. ед. Все инкубационные сосуды увлажняли дистиллированной водой до достижения 60% от ПВ. Такая влажность образцов поддерживалась на протяжении всего эксперимента, для чего через каждые 3 сут сосуды/боксы взвешивались и увлажнялись в соответствии с потерей веса.

Длительность экспозиции составила 30 сут при температуре 21/18 °С (день/ночь) и искусственном освещении с чередованием режима 16/8 ч (600 люкс). Пробы отбирали в четырёхкратной повторности на 3, 10 и 30-е сут после начала эксперимента. В итоге было подготовлено 168 проб (1 почва × 2 серии сосудов × 7 вариантов содержания мелиорантов × 4 повторности × 3 временные точки отбора проб).

**Химический анализ.** Образцы почв для химического анализа высушивали при 105 °С, измельчали и просеивали через сито с диаметром пор 1 мм. Для оценки  $pH$  в солевой (0,01М  $CaCl_2$ ) вытяжке почвенных образцов готовили экстракты при соотношении почва:раствор = 1:2, перемешивая в течение 2-х часов [19].

Подвижные формы ТМ определяли по методике BCR (первый этап) в 0,11 М  $CH_3COOH$  ( $pH=3$ ), соотношение почва/раствор=1:2,4 (10г+24 мл), взбалтывали 16 ч на шейкере, после чего взвесь центрифугировали (5000 об., 10 мин). Элементный состав супернатанта определяли методом индуктивно связанной плазмы на оптическом эмиссионном спектрометре (ICP-OES; Varian Vista Pro, Varian, Australia). Результаты пересчитывали на мг/кг содержания элемента в почве.

**Биотестирование по выживаемости *Eisenia fetida*.** Токсикологические исследования проводили с применением генетически чистой культуры красных калифорнийских червей *E.*

*fetida*. Тест на выживаемость *E. fetida* в пробах проводился на основании протоколов OECD 207/222 [20, 21]. В каждый бокс помещали по 10 взрослых особей (вес каждой особи 380–550 мг). Количество живых особей учитывали через 3, 10 и 30 сут после начала эксперимента. Результаты выражали в % от количества выживших особей в пробах по отношению к началу опыта.

**Статистическая обработка результатов.** Статистическая обработка данных проведена с использованием пакета программ Real Statistics для Excel. Достоверность отличий наблюдаемых значений в вариантах с внесением мелиоранта от контрольной почвы проверялось с использованием теста ANOVA – Tukey-Kramer тест (HSD) при уровне значимости  $p < 0,05$ . Все графики построены с использованием SigmaPlot 11.0 Software (USA).

В целях выявления приоритетных факторов и оценки закономерностей наблюдаемых значений проведён анализ методом главных компонент (МГК). Расчёты проводили с использованием корреляционной матрицы Пирсона в пакете программ XLSTAT-Base для Excel.

## Результаты и обсуждение

**Влияние мелиорантов на кислотность почв.** Фактор  $pH$  оказывает существенное влияние на поведение ряда ТМ в почвах, при его повышении подвижность зачастую снижается вследствие образования труднорастворимых соединений [22, 23]. Внесение мелиорантов оказало воздействие на  $pH_{CaCl_2}$  и привело к увеличению этого показателя (рис. 1). Варианты, содержащие 0,05% BC и 0,05% LG, не отличались от контрольного варианта и характеризовались значениями  $pH_{CaCl_2}$  6,0±0,05. В максимальных дозах внесения значения  $pH_{CaCl_2}$  составили 7,1±0,2, значения в пробах были стабильными на протяжении всего инкубационного периода.

**Влияние мелиорантов на подвижность тяжёлых металлов в почве.** Внесение мелиорантов в почву уменьшает подвижность ТМ и их содержание на 2–60%, причем меньшая эффективность (3–35%) характерна для наиболее подвижных и, следовательно, наиболее

опасных токсикантов – соединений Zn и Cd. Эффект от внесения зависел от вида мелиоранта, его концентрации в почвах и от времени экспозиции.

**Кадмий.** Внесение BC и LG в концентрациях 0,05% и более достоверно снизило концентрацию подвижных форм Cd через 10 дней инкубации в сравнении с контрольной почвой (рис. 2 А и Б). Максимальное снижение концентрации Cd выявили в пробах, отобранных на 30-е сутки и содержащих 5% BC и 1% LG.

**Свинец.** Внесение BC оказало существенное влияние на концентрацию подвижных форм Pb в почве (рис. 3 А). Концентрация Pb в контрольных пробах достигала  $1403,67 \pm 110,11$  мг/кг, в то время как в пробах с 5% BC к моменту окончания эксперимента концентрация Pb составила  $519,0 \pm 72,1$  мг/кг. Внесение LG также оказало положительное влияние на концентрации этого поллютанта в почвах, однако статистически значимых различий между

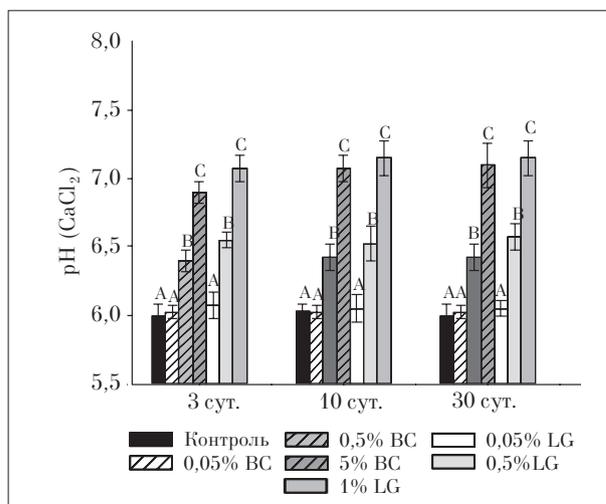


Рис. 1. Влияние доз внесения BC и LG на pH почв в разные сроки экспозиции. (Здесь и далее: на диаграммах представлены средние значения наблюдаемого показателя (n=4), планка погрешностей отражает стандартные отклонения от среднего; значения, обозначенные разными буквами, различаются достоверно)

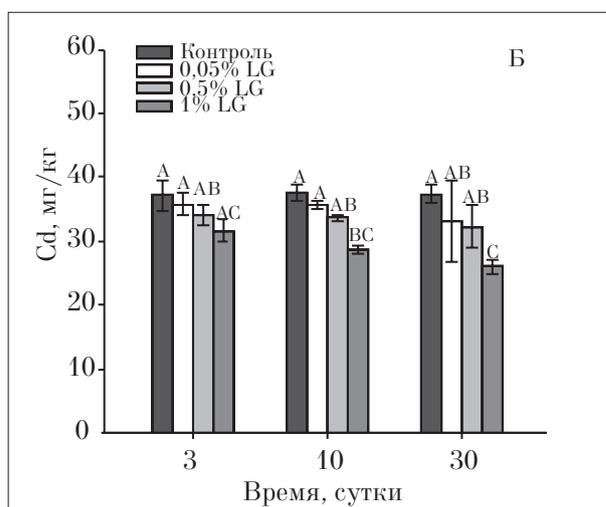
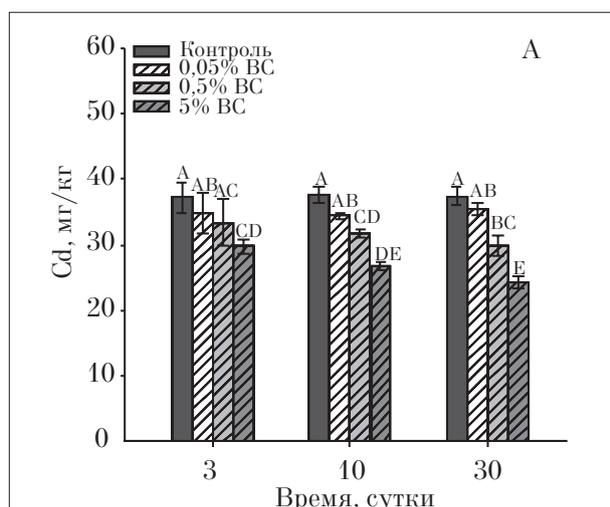


Рис. 2. Влияние BC (А) и LG (Б) на содержание подвижных форм кадмия (мг/кг) в почве

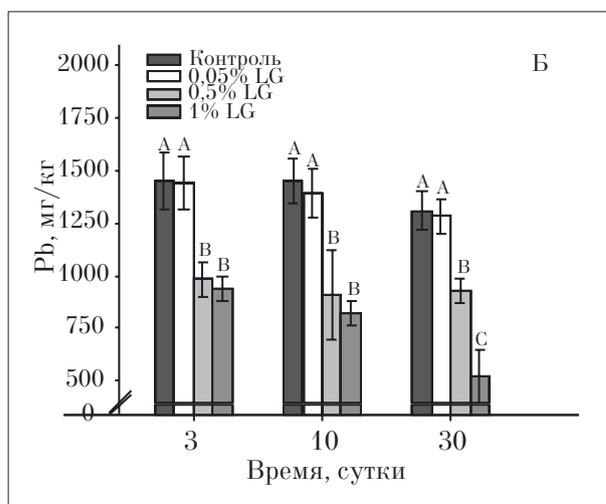
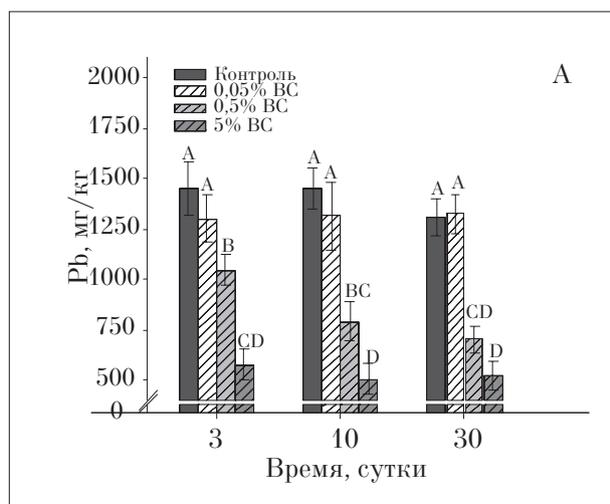


Рис. 3. Влияние BC (А) и LG (Б) на содержание подвижных форм свинца (мг/кг) в почве

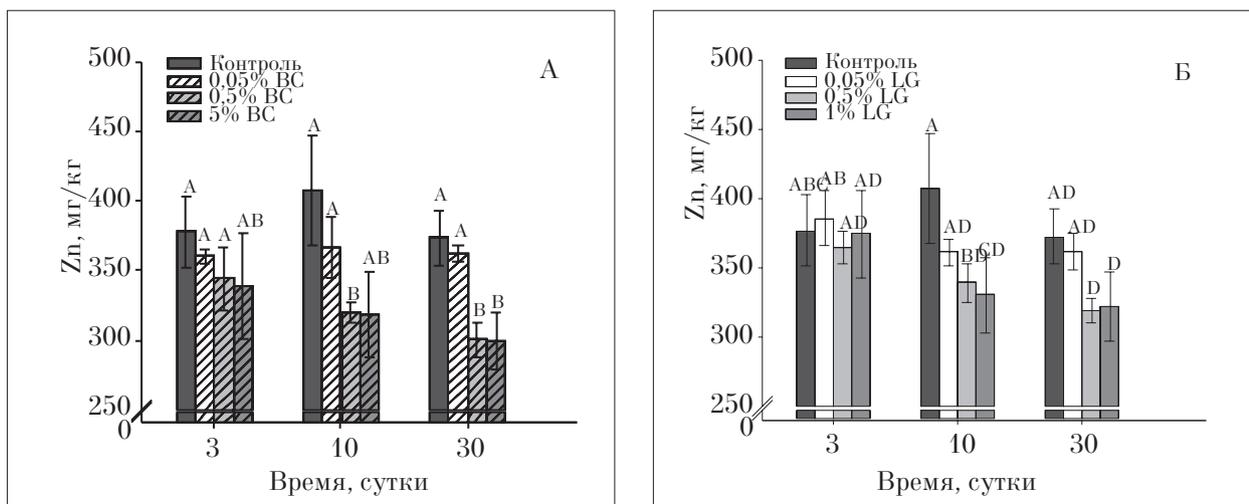


Рис. 4. Влияние ВС (А) и LG (Б) на содержание подвижных форм цинка (мг/кг) в почве

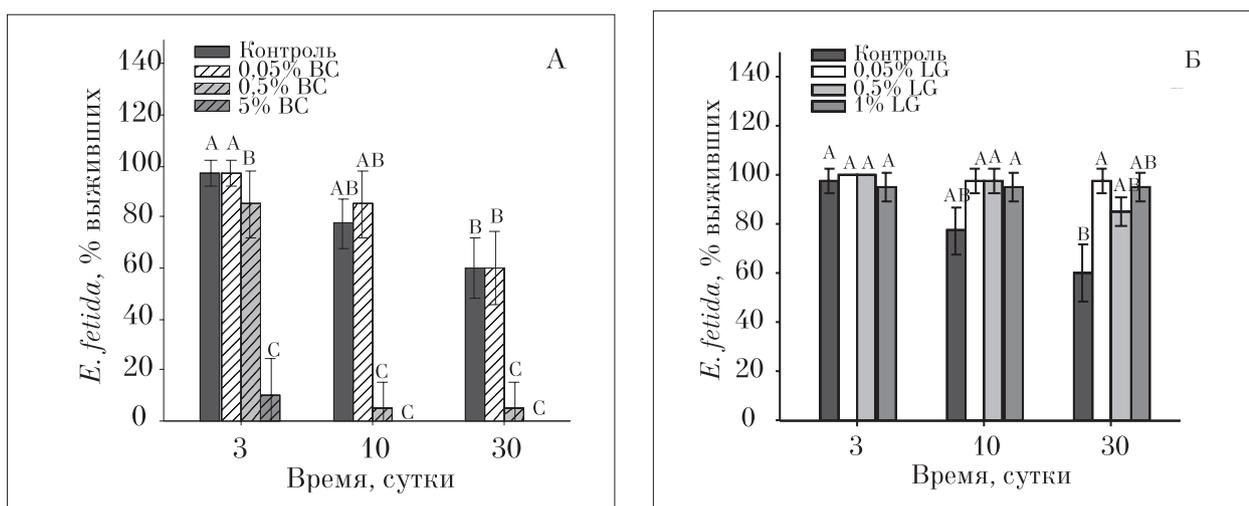


Рис. 5. Влияние ВС (А) и LG (Б) на выживаемость червей *E. fetida* в почве, загрязнённой тяжёлыми металлами

данными для доз внесения 0,5 и 1% на 3 и 10 суток отбора не выявлено (рис. 3 Б).

**Цинк.** Выявили тенденцию снижения концентрации подвижных форм цинка в пробах, обработанных ВС и LG. Эффект зависел как от срока экспозиции проб с мелиорантом, так и от его дозы (рис. 4 А, Б).

**Экотоксикологическая оценка.** Результаты опыта по оценке выживаемости тест-организмов *E. fetida* в пробах приведены на рис. 5 А, Б. **Выживаемость червей в контрольных пробах,** содержащих только загрязнённую ТМ почву, снижалась по мере длительности эксперимента. В то время как в течение первых 10 дней эксперимента полиметаллическое загрязнение проб не оказывало существенного влияния на показатель выживаемости червей, по завершении эксперимента на 30-е сутки количество живых особей сократилось до  $60,0 \pm 11,6$  %.

Внесение ВС вызывало токсический эффект по отношению к *E. fetida*. В пробах, обработанных 5% ВС, погибло более 80% особей в течение первых 3-х суток эксперимента. Токсический эффект также наблюдался в пробах с 0,5% ВС – количество погибших особей за инкубационный период 30 суток составило  $95,0 \pm 10,0$ %. Пробы, содержащие 0,05% ВС, не отличались от контрольных проб и характеризовались как токсичные (гибель тест-организмов –  $60,0 \pm 14,1$  %).

Одной из возможных причин токсического действия ВС на беспозвоночных может быть эффект блокирования межпорового пространства почвенных частиц и агрегатов, отмеченный в случаях внесения иных Биочаров в почвы [24]. В качестве косвенных признаков, подтверждающих это предположение, можно отметить тот факт, что все погибшие особи располагались на поверхности почвенных

проб, в отличие от контроля, где погибшие особи были преимущественно на дне сосудов.

Внесение LG, напротив, оказало выраженное детоксицирующее действие по отношению к контролю. Пробы, содержащие этот препарат, характеризовались как не токсичные на протяжении всего периода инкубации. Эффект от внесения не зависел от концентрации мелиоранта в почве.

**Статистический анализ методом главных компонент (МГК).** Анализ главных компонент был выполнен в целях оценки и проверки взаимосвязи между откликом тест-организмов *E. fetida* и химическими свойствами почвенных образцов. МГК был проведён на основании массива из 5 показателей, полученных по завершении инкубационного периода на 30-е сутки. Результаты представлены на рисунке 6. Значения, полученные в четырёх повторностях для каждого варианта внесения мелиоранта, не усредняли, а анализировали как независимые наблюдения (отдельная точка).

Проведённый анализ показал, что влияние дозы мелиорантов на концентрацию подвижных форм тяжёлых металлов статистически значимо для 2/3 проанализированных проб и составляет до 69,90% наблюдаемой суммарной дисперсии (первая главная компонента F1) (69,90% суммарной дисперсии). Вторая компонента F2 описывает только 18,15% суммарной дисперсии. Диаграмма проекции координат проб в двухфакторном пространстве показала, что можно выделить несколько обособленных кластеров.

Кластер I объединяет пробы, не отличающиеся по значениям показателей от контрольных почвенных проб (S). Более широкий кластер II объединяет пробы, в которые был внесён LG, в них было отмечено наиболее сильное положительное влияние на выживаемость *E. fetida*. В кластер III определились пробы, в которых, несмотря на значительную иммобилизацию подвижных форм ТМ, наблюдалась повышенная смертность тест-организмов – вектор показателя выживаемости *E. fetida*, и точки, обозначающие пробы, расположены в противоположных квартилях.

### Заключение

Проведено сравнительное изучение ремедиационного действия двух мелиорантов (BC и LG) по отношению к дерновому горизонту аллювиальной почвы, загрязнённой тяжёлыми металлами. Результаты эксперимента показали, что под действием мелиорантов наблюдается снижение концентрации подвижных форм Pb, Cd, Zn в почвах, по-видимому, за счёт более прочного их закрепления в почве в результате не только изменения pH среды, но и дополнительного образования комплексных соединений с органическим веществом или удерживания в микропористой структуре.

Экотоксикологическая характеристика проб с применением аппликатного метода биотестирования на *E. fetida* выявила различия в

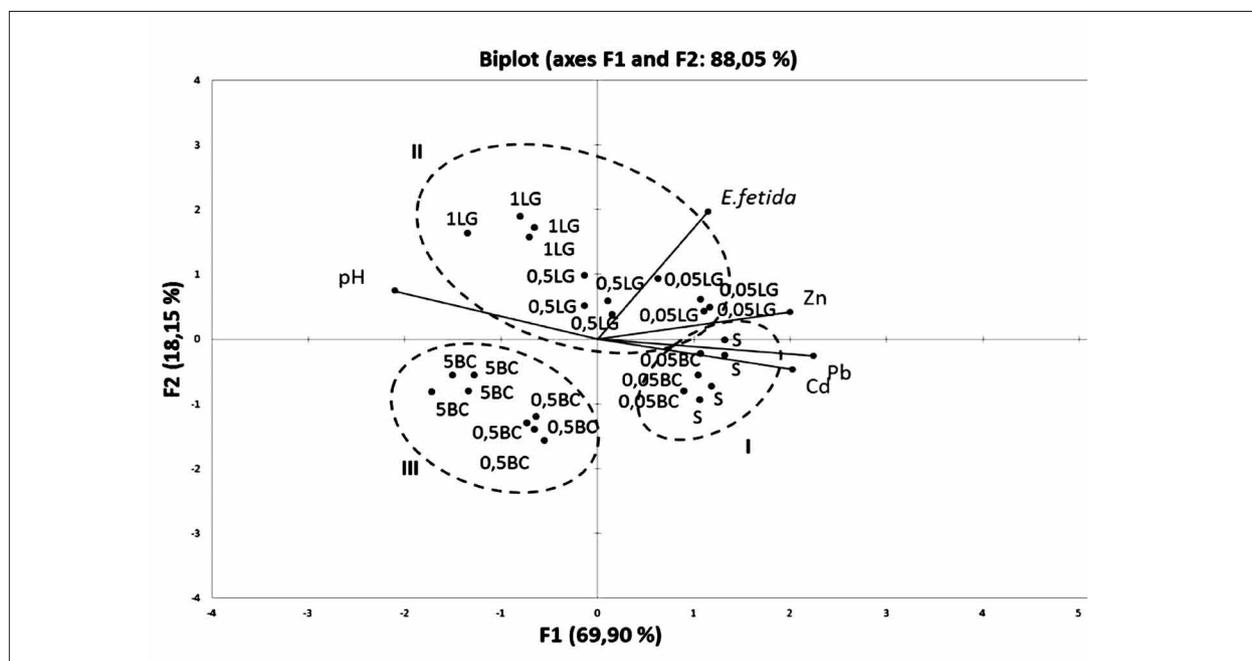


Рис. 6. Диаграмма проекций анализируемых образцов в плоскости двух главных компонент F1, F2 и векторов анализируемых тест-параметров.

Условные обозначения: BC – Биочар; LG – Лигногумат; S – контрольная почва.

действии мелиорантов. При содержании 0,5 и 5% ВС в почвенных образцах установлено резкое снижение выживаемости червей уже в первые сроки наблюдений, тогда как при добавлении 0,05–1% LG токсическое действие тяжёлых металлов на тест-организмы снижалось.

Проведённые исследования подтвердили, что при оценке ремедиационного действия мелиорантов недостаточно оперировать только данными об изменении химического состава образцов, так как вносимые препараты могут как снижать, так и усиливать экотоксичность почв для биоты.

*Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 16-34-60011 мол\_а\_дк. Авторы благодарят сотрудников Чешского университета естественных наук в г. Прага и лично инж. Катку Брендovou за помощь в определении элементного состава проб на ИСР, программу Erasmus Mundus IAMONET-RU за организационную поддержку во время работы в Чехии.*

## References

1. Perminova I., Hatfield K., Hertkorn N. (Eds.). Use of humic substances to remediate polluted environments: from theory to practice. Netherlands: Springer, 2005. 506 p.
2. Lehmann J., Joseph S. (Eds.). Biochar for environmental management: science and technology. London, UK: Earthscan, 2009. 404 p.
3. Beesley L., Moreno-Jiménez E., Gomez-Eyles J.L., Harris E., Robinson B., Sizmur T. A review of biochars' potential role in the remediation, revegetation and restoration of contaminated soils // *Environmental Pollution*. 2011. V. 159 (12). P. 3269–3282.
4. Castellini M., Giglio L., Niedda M., Palumbo A.D., Ventrella D. Impact of biochar addition on the physical and hydraulic properties of a clay soil // *Soil and Tillage Research*. 2015. V. 154. P. 1–13.
5. Lim T.J., Spokas K.A., Feyereisen G., Novak J.M. Predicting the impact of biochar additions on soil hydraulic properties // *Chemosphere*. 2016. V. 142. P. 136–144.
6. Abujabhah I.S., Bound S.A., Doyle R., Bowman J.P. Effects of biochar and compost amendments on soil physicochemical properties and the total community within a temperate agricultural soil // *Applied Soil Ecology*. 2016. V. 98. P. 243–253.
7. Forján R., Asensio V., Rodríguez-Vila A., Covelo E.F. Contribution of waste and biochar amendment to the sorption of metals in a copper mine tailing // *Catena*. 2016. V. 137. P. 120–125.
8. Yakimenko O.S., Terekhova V.A. Humic preparations and the assessment of their biological activity for certification purposes // *Eurasian Soil Science*. 2011. V. 44. № 11. P. 1222–1230.
9. Kydralievа K.A., Zhorobekova Sh. Zh., Topilskaya O.M., Akulova M.I., Terekhova V.A. Experimental characterization of remediation properties of different humic preparations in copper contaminated soil // *Teoreticheskaya i prikladnaya ekologiya*. 2015. № 2. P. 74–79. [Кыдралиева К.А., Жоробекова Ш.Ж., Топильская О.М., Акулова М.И., Терехова В.А. Экспериментальная характеристика ремедиационных свойств гуминовых препаратов разного генезиса по фону загрязнения почв медью // *Теоретическая и прикладная экология*. 2015. № 2. С. 74–79].
10. Trevisan S., Francioso O., Quaggiotti S., Nardi S. Humic substances biological activity at the plant – soil interface: From environmental aspect to molecular factors // *Plant Signal Behav*. 2010. V. 5 (6). P. 635–643.
11. Manzano R., Esteban E., Peñalosa J.M., Alvarenga P. Amendment application in a multicontaminated mine soil: effects on soil enzymatic activities and ecotoxicological characteristics // *Environ Sci Pollut Res*. 2014. V. 21 (6). P. 4539–4550.
12. Marks E.A.N., Mattana S., Alcañiz J.P., Domene X. Biochars provoke diverse soil mesofauna reproductive responses in laboratory bioassays // *European Journal of Soil Biology*. 2014. V. 60. P. 104–111.
13. Pukalchik M.A., Terekhova V.A., Yakimenko, O. S., Kydralievа, K. A., Akulova M.I. Triad method for assessing the remediation effect of humic preparations on urbanozems // *Eurasian Soil Science*. 2015. V. 48 (6). P. 645–663.
14. Kuppusamy S., Thavamani P., Megharaj M., Venkateswarlu K., Naidu R. Agronomic and remedial benefits and risks of applying biochar to soil: Current knowledge and future research directions // *Environment International*. 2016. V. 87. P. 1–12.
15. Vaněk A., Ettler V., Grygar T., Borůvka L., Šebek O., Drábek O. Combined chemical and mineralogical evidence for heavy metal binding in mining- and smelting-affected alluvial soils // *Pedosphere*. 2005. V. 18 (4). P. 464–478.
16. Břendová K., Tlustoš P., Száková J. Biochar immobilizes cadmium and zinc and improves phytoextraction potential of willow plants on extremely contaminated soil // *Plant Soil Environ*. 2015. V. 61 (7). P. 303–308.
17. Becquer T., Dai J., Quantin C., Lavelle P. Sources of bioavailable trace metals for earthworms from a Zn-, Pb- and Cd-contaminated soil // *Soil Biology and Biochemistry*. 2005. V. 37 (8). P. 1564–1568.
18. Sizmur T., Hodson M.E. Do earthworms impact metal mobility and availability in soil? – A review // *Environmental Pollution*. 2009. V. 157 (7). P. 1981–1989.
19. Fotyma M., Jadczyzyn T., Jozefaciuk G.. Hundredth molar calcium chloride extraction procedure. Part II: calibration with conventional soil testing methods for pH // *Communications in Soil Science & Plant Analysis*. 1998. V. 29. P. 1625–1632.
20. Earthworm acute toxicity tests. Guideline 207. Paris, France: Organization for Economic Cooperation and Development (OECD). 1984. 9 p.
21. Earthworm reproduction test (*Eisenia fetida*/*Eisenia andei*) Guideline 222. Paris, France: Organization for Economic Cooperation and Development (OECD). 1984. 18 p.
22. Alekseev Y.V. Heavy metals in soils and plants. L.: Agropromizdat, 1987. 142 p. [Алексеев Ю.В. Тяжёлые металлы в почвах и растениях. Л.: Агропромиздат, 1987. 142 с.].
23. Sauve S., Hendershot W., Allen S.E. Solid-solution partitioning of metals in contaminated soils: dependence on pH, total metal burden, and organic matter // *Environmental Science and Technology*. 2000. V. 34. P. 1125–1131.
24. Uchimiya M., Bannon D. Solubility of lead and copper in biochar-amended small arms range soils: influence of soil organic carbon and pH // *J. Agric. Food Chem*. 2013. V. 61 (32). P. 7679–7688.