

На правах рукописи



Рыбак Анна Викторовна

**АНАЛИЗ СОЧЕТАННОГО ДЕЙСТВИЯ РАДИАЦИОННОГО И  
ХИМИЧЕСКОГО ФАКТОРОВ НА ПОПУЛЯЦИЮ ДОЖДЕВЫХ ЧЕРВЕЙ  
СЕМЕЙСТВА LUMBRICIDAE**

Специальность 1.5.1 Радиобиология

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание учёной степени  
кандидата биологических наук

Сыктывкар – 2021

Работа выполнена в Институте биологии Коми научного центра Уральского отделения Российской академии наук (ИБ ФИЦ Коми НЦ УрО РАН).

**Научный руководитель:** Гераськин Станислав Алексеевич, доктор биологических наук, профессор

**Официальные оппоненты:** Рубанович Александр Владимирович, доктор биологических наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт общей генетики им. Н. И. Вавилова Российской академии наук, заведующий лабораторией экологической генетики

Сарапульцева Елена Игоревна, доктор биологических наук, доцент, Обнинский институт атомной энергетики – филиал федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Национальный исследовательский ядерный университет «МИФИ», профессор отделения биотехнологий

**Ведущая организация:** Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова», факультет почвоведения

Защита состоится «16» сентября 2021 г. в \_\_\_\_\_ час. \_\_\_\_\_ мин. на заседании диссертационного совета 24.1.013.01 по радиобиологии при Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Всероссийский научно-исследовательский институт радиологии и агроэкологии» по адресу: 249032, Калужская область, г. Обнинск, Киевское шоссе, 109 км, ФГБНУ ВНИИРАЭ, здание 1.

Факс: (484) 396-80-66. Электронная почта: rirae70@gmail.com.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте ФГБНУ ВНИИРАЭ, <http://www.ds.rirae.ru>.

Автореферат разослан «\_\_\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2021 г.

Учёный секретарь  
диссертационного совета



Бондаренко Екатерина Валерьевна

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы.** В связи с увеличением техногенного влияния на окружающую среду важной задачей является оценка состояния наземных экосистем в настоящий момент и прогнозирование последствий антропогенного воздействия на биоту. Все загрязняющие вещества, в том числе радионуклиды и тяжёлые металлы, рано или поздно попадают в почву и приводят к её деградации – ухудшению свойств как среды обитания и необратимым изменениям структуры естественных популяций почвенных обитателей, которые составляют основу структуры наземных сообществ [Алексахин, 2009; Симонович, 2013; Lal et al., 2020]. При этом на большей части загрязнённых территорий природные популяции испытывают хроническое воздействие агентов химической и физической природы, которое можно охарактеризовать как низкодозовое [Eggen et al., 2004; Salbu et al., 2005; Geras'kin et al., 2007; Salbu, 2009; Lind et al., 2013; Канева и др., 2015]. Для радиоэкологических и экотоксикологических исследований дождевые черви являются отличными биоиндикаторами, поскольку обладают низкой миграционной активностью, тесно контактируют с загрязнённой средой и способны аккумулировать генотоксиканты [Peijnenburg, Vijver, 2009; Šuteková, Hofman, 2011; Santorufo et al., 2012; Ali, Naaz, 2013]. Кроме этого, дождевых червей относят к референтным видам, рекомендуемым для оценки последствий радиоактивного загрязнения на биоту [ICRP, 2007], и активно используют при изучении хронического радиационного воздействия на природные популяции [Lourenço et al., 2011a; 2011b; 2012; 2013; Mrdakovic Popic et al., 2012]. Радиоактивное и химическое загрязнение почвы индуцирует широкий спектр биологических эффектов у организмов на разных уровнях структурно-функциональной организации. Причём при малых дозах облучения и концентрациях веществ реакции на стресс можно зафиксировать на молекулярно-клеточном уровне [Hertal-Aas et al., 2011], а при гораздо больших воздействиях – на организменном и популяционно-видовом уровнях [Alonzo et al., 2008; Sowmithra et al., 2015]. В настоящее время актуальной проблемой остаётся оценка хронического радиационного воздействия на природные популяции, а также выявление молекулярно-клеточных механизмов адаптации, позволяющих организмам устойчиво существовать в условиях хронического низкодозового воздействия генотоксикантов [Mothersill et al., 2007; Brechignac et al., 2016]. Поэтому изучение эффектов низкоинтенсивного воздействия радиационного и химического факторов у дождевых червей семейства Lumbricidae из природных популяций позволит расширить знания о механизмах действия и последствиях для биоты ионизирующих излучений в окружающей среде и внести значительный вклад в радиоэкологические исследования.

**Степень разработанности проблемы.** В исследованиях хронического радиационного воздействия на наземные экосистемы почвенные животные являются одними из наиболее подходящих тест-объектов, поскольку обладают низкой миграционной активностью, высокой плотностью популяции и видовым разнообразием, характеризуются разнообразными экологическими связями, тесно контактируют с загрязнённой средой и способны аккумулировать радионуклиды [Криволуцкий,

1985].

В период становления и развития радиоэкологии проблеме воздействия ионизирующего излучения на почвенных беспозвоночных уделяли намного больше внимания, чем в настоящее время. Исследования В. А. Турчаниновой, Д. А. Криволуцкого, Т. М. Семяшкиной, З. А. Михальцовой в 70-80-е гг. XX века в значительной мере способствовали изучению биологических эффектов в природных популяциях дождевых червей. В своих работах авторы отмечали негативное влияние загрязнённых радионуклидами почв на плотность и структуру почвенной фауны [Криволуцкий и др., 1980; Криволуцкий, 1983; 1985; 1987; 1994]. В 80-х гг. сотрудники Института биологии Коми НЦ УрО РАН выявили снижение численности и среднего веса дождевых червей на участках, загрязнённых изотопами уранового ряда. Кроме этого, показано, что дождевые черви накапливают радиоактивные элементы в большей мере, чем позвоночные этих биогеоценозов [Разработка..., 1977].

В последнее десятилетие интерес к изучению влияния радиации на дождевых червей существенно снизился. Однако всё же выполнено несколько интересных исследований. Здесь можно отметить работы Hertel-Aas et al. [Hertel-Aas et al., 2007; 2011a; 2011b] и Lourenço et al. [Lourenço et al., 2011a; 2011b; 2012; 2013], а также единичные лабораторные эксперименты [Hingston et al., 2003; Jackson et al., 2005; Wilding et al., 2006] и полевые исследования, где загрязнённая среда, помимо радионуклидов, содержит тяжёлые металлы [Mrdakovic Popic et al., 2012; Fujita et al., 2014; Колесникова и др., 2015]. Результаты этих исследований свидетельствуют о необходимости регистрации биологических эффектов у дождевых червей на разных уровнях организации. Таким образом, анализ сочетанного действия химического и радиационного факторов на популяции дождевых червей позволит получить новую информацию о длительном воздействии низкоинтенсивного ионизирующего излучения на живые организмы в среде их обитания и дополнить базу данных эффектов для решения задач защиты окружающей среды.

**Цель диссертационной работы:** изучить биологические эффекты на разных уровнях структурно-функциональной организации в природной популяции дождевых червей сем. Lumbricidae в условиях загрязнения почвы тяжёлыми естественными радионуклидами (ТЕРН) и тяжёлыми металлами (ТМ).

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие **задачи:**

- 1) оценить степень радиоактивного и химического загрязнения почв исследуемых участков (Ухтинский район, Республика Коми);
- 2) рассчитать дозовые нагрузки на дождевых червей;
- 3) оценить уровни повреждений ДНК дождевых червей *Aporrectodea caliginosa* и *Lumbricus rubellus*, собранных на фоновых участках и участках с разным уровнем радиоактивного и химического загрязнения почв;
- 4) изучить выживаемость дождевых червей *Aporrectodea caliginosa* с фонового и загрязнённых ТЕРН и ТМ участков после дополнительного воздействия  $\gamma$ -облучения или Cd;

5) проанализировать репродуктивную способность дождевых червей *Aporrectodea caliginosa* с фонового и импактного участков;

6) определить плотность популяции дождевых червей сем. Lumbricidae на участках с разным уровнем радиоактивного и химического загрязнения, оценить её зависимость от мощности дозы облучения и воздействия других факторов среды;

7) оценить генетический полиморфизм и выявить генетическую структуру популяции дождевых червей *Aporrectodea caliginosa* на интактном и загрязнённых ТЕРН и ТМ участках.

**Научная новизна.** Впервые для дождевых червей *Aporrectodea caliginosa* и *Lumbricus rubellus* из природных популяций, населяющих участки с фоновыми и повышенными содержаниями ТЕРН и ТМ, определены исходные уровни одноклеточных и двуклеточных повреждений ДНК. Впервые при статистически значимых различиях в общей плотности популяции выявлены статистически значимые различия в репродуктивной способности *A. caliginosa*, обитающих на участке с повышенными содержаниями ТЕРН и ТМ и фоновом участке. Впервые зафиксирована адаптивная реакция у дождевых червей *A. caliginosa*, обитающих в условиях хронического низкодозового воздействия ТЕРН и ТМ, на острое  $\gamma$ -облучение, выраженная в повышенной скорости репарации ДНК. Впервые выявлена повышенная чувствительность дождевых червей *A. caliginosa*, ранее подвергнутых хроническому низкодозовому радиационному и химическому воздействию, к действию Cd в более высокой дозе по показателю выживаемости. Впервые для популяции *A. caliginosa*, сформировавшейся на территориях с разной степенью радиоактивного и химического загрязнения почвы, показана сложная внутривидовая генетическая структура, состоящая из трёх кластеров.

**Теоретическая и практическая значимость.** Полученные экспериментальные данные и результаты теоретического обобщения расширяют существующие представления о влиянии радиоактивного и химического загрязнения окружающей среды на природные популяции почвенных беспозвоночных, вносят вклад в понимание потенциальных механизмов их приспособления к обитанию в условиях многокомпонентного загрязнения почвы. Полученные данные являются основой при оценке отдалённых последствий для биоты хронического низкоинтенсивного радиационного и химического воздействия и могут внести вклад в разработку концепции использования техногенно загрязнённых территорий.

**Методология и методы исследования.** Объектами исследования выбраны олигохеты сем. Lumbricidae (*Aporrectodea caliginosa* и *Lumbricus rubellus*). Дождевые черви включены в список референтных видов наземных экосистем для оценки последствий радиационного воздействия на биоту [Larsson, 2008] и активно используются при тестировании химических веществ и определении степени их опасности [OECD, 1984; 2004].

Район исследований (окрестности пос. Водный, Россия) характеризуется техногенно повышенным радиационным фоном. Источником загрязнения почв явились высокоминерализованные буровые рассолы и продукты производства из них

концентратов радия, а на одном из участков – также отходы вторично переработанных урановых руд. Исследования проводили на двух фоновых и двух экспериментальных участках, характеризующихся разной степенью радиоактивного и химического загрязнения почвы.

Почвенные образцы для физико-химического анализа отбирали методом «конверта» с глубины 0–20 см [ГОСТ 17.4.4.02-84]. Радионуклиды ( $^{238}\text{U}$ ,  $^{230}\text{Th}$ ,  $^{226}\text{Ra}$ ,  $^{210}\text{Po}$ ,  $^{210}\text{Pb}$ ,  $^{232}\text{Th}$ ,  $^{228}\text{Th}$ ) в почве определяли радиохимическими и спектрометрическими методами в аккредитованной (аттестат № РОСС RU. 0001.21PK70) лаборатории миграции радионуклидов и радиохимии Института биологии ФИЦ Коми НЦ УрО РАН. Концентрации Pb, Zn, Cd, Cu, Co, Ni, Mn, Cr, Ba, Fe и As определяли стандартными методами в аккредитованной (аттестат № РОСС RU. 0001.511257) экоаналитической лаборатории «Экоаналит» Института биологии ФИЦ Коми НЦ УрО РАН. Для характеристики радиационной обстановки на участках дозиметром ДКГ02У «Арбитр» (ООО НПП «Доза», Россия) измеряли мощность амбиентного эквивалента дозы  $\gamma$ -излучения в воздухе на высоте 1 м от поверхности почвы. Степень загрязнения почвы тяжёлыми металлами и As оценивали по суммарному показателю загрязнения почв (СПЗ,  $Z_c$ ) [Ревич, 1982]. Дозовые нагрузки на дождевых червей рассчитывали в программе ERICA Assessment Tool Version 1.3 ([www.ERICA-tool.com](http://www.ERICA-tool.com)) и по методике [Thomas, Liber, 2001].

Уровни повреждения ДНК оценивали с использованием метода ДНК-комет [Tice et al., 2000] с некоторыми модификациями. Выживаемость и репродуктивную способность оценивали для дождевых червей в искусственном почвенном субстрате, подготовленном в лабораторных условиях с использованием в качестве ориентира методик OECD [OECD, 1984; 2004] с некоторыми модификациями. Оценку генетического полиморфизма популяции *A. caliginosa* проводили с помощью анализа полиморфизма длин амплифицированных фрагментов ДНК (AFLP). Подтверждение видовой принадлежности дождевых червей выполнили с использованием секвенирования фрагмента последовательности гена цитохромоксидазы I (COI). Молекулярно-генетический анализ выполняли на оборудовании ЦКП «Молекулярная биология» ИБ ФИЦ Коми НЦ УрО РАН.

### **Положения, выносимые на защиту.**

1. Почвы изученных участков вблизи пос. Водный (Ухтинский район, Республика Коми) характеризуются фоновыми и повышенными уровнями загрязнения ТЕРН и ТМ, а дозовые нагрузки для дождевых червей могут превышать допустимые уровни хронического радиационного воздействия для биоты.

2. Уровни повреждений ДНК как *A. caliginosa*, так и *L. rubellus* из популяций, обитающих в условиях сочетанного действия повышенных концентраций ТЕРН и ТМ и фонового воздействия, не отличаются между собой, что может свидетельствовать об адаптации к хроническому радиоактивному и химическому воздействию путём закрепления в популяции толерантных и элиминации чувствительных к загрязнению особей.

3. Радиоадаптация в виде более эффективной репарации ДНК и повышенная

чувствительность к Cd выявлены у дождевых червей *A. caliginosa*, более 60 лет обитающих в условиях хронического радиоактивного и химического загрязнения почвы. Ускоренная репарация повреждений ДНК способна обеспечить одинаковую выживаемость особей на фоновых и импактных участках.

4. Плотность популяции дождевых червей семейства Lumbricidae в почвах сильно загрязнённого радионуклидами и тяжёлыми металлами участка снижена относительно фоновой и менее загрязнённой территорий на фоне пониженной репродуктивной способности особей *A. caliginosa* с наиболее загрязнённого участка.

5. Генетическое разнообразие популяции *A. caliginosa*, населяющей северо-таёжные природно-техногенные ландшафты с различным содержанием в почве ТЕРН и ТМ и фоновые территории, не зависит от степени загрязнения поллютантами среды обитания. Исследованная популяция *A. caliginosa* характеризуется сложной внутривидовой генетической структурой, представленной тремя генетическими кластерами.

**Достоверность результатов.** Результаты исследования получены с использованием общепринятых научных методов и современного оборудования. Достоверность результатов обеспечена достаточными для статистической обработки объёмами выборок. Анализ экспериментальных данных осуществляли общепринятыми статистическими методами в программах MS Excel (с надстройкой GenAIEx), MEGA, STATISTICA, STRUCTURE, программной среде R и онлайн-сервисе CLUMPAK. Значимость статистических оценок определяли с использованием критериев Стьюдента, Мантела-Кокса, Манна-Уитни, а также бутстреп-метода.

**Соответствие диссертации паспорту научной специальности.** В диссертационном исследовании представлены результаты изучения хронического воздействия низкоинтенсивного ионизирующего излучения на дождевых червей при наличии в почве повышенных концентраций тяжёлых металлов в соответствии с требованиями специальности 1.5.1 Радиобиология, охватывающей основы действия излучений на ДНК и репарации лучевых повреждений (п. 4), радиоэкологии (п. 9), принципы и методы радиационного мониторинга (п. 10), отдалённые последствия действия излучений, хроническое действие радиации и особенности биологического действия малых доз радиации (п. 11).

**Апробация работы.** Основные результаты диссертационного исследования представлены на Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Биодиагностика состояния природных и природно-техногенных систем» (Киров, 2012; 2014; 2016), Всероссийской молодёжной научной конференции «Актуальные проблемы биологии и экологии» (Сыктывкар, 2014; 2015; 2017; 2018; 2021), 18-й Международной Пущинской школе-конференции молодых учёных «Биология – наука XXI века» (Пущино, 2014; 2016), Международной конференции «Биодиагностика в экологической оценке почв и сопредельных сред» (Москва, 2013), IV Международной конференции «Радиоактивность и радиоактивные элементы в среде обитания человека» (Томск, 2013), III Информационной школе молодого ученого (Екатеринбург, 2013), XV Всероссийской молодёжной школы-

конференции по актуальным проблемам химии и биологии (Владивосток, 2014), 41st Annual Meeting of the European Radiation Research Society ERR2014 (Греция, Родос, 2014), XVII Всероссийском совещании по почвенной зоологии, посвященном 75-летию со дня рождения чл.-корр. РАН Д. А. Криволицкого (Москва-Сыктывкар, 2014), 4th International Conference «Modern Problems of Genetics, Radiobiology, Radioecology and Evolution» (Санкт-Петербург, 2015), Международной научной конференции, посвящённой 80-летию со дня рождения академика Ю. П. Алтухова и 45-летию основания лаборатории популяционной генетики им. Ю. П. Алтухова ИОГен РАН (Звенигород, 2017).

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант 13-04-90351 «Оценка генетической стабильности у животных разных таксономических групп в условиях радиоактивного загрязнения среды обитания», 2013–2014 гг.).

**Личный вклад автора.** Автор лично принимал участие на всех этапах выполнения диссертационного исследования: формулировании целей и задач, анализе литературы, сборе полевого материала, проведении экспериментов, статистической обработке данных. Автор принимал активное участие в выполнении молекулярно-генетического анализа и подготовке публикаций по теме работы.

**Публикации.** По теме диссертации опубликовано 19 научных работ, в том числе 5 статей – в изданиях, рекомендованных ВАК.

**Структура и объем работы.** Диссертация состоит из введения, 4 глав, заключения, выводов, списка сокращений и условных обозначений и списка литературы, включающего 328 источников, из них 197 на иностранном языке. Диссертация изложена на 140 страницах, содержит 20 таблиц и 23 рисунка.

**Благодарности.** Автор выражает огромную благодарность научному руководителю и сотрудникам отдела радиоэкологии ИБ ФИЦ Коми НЦ УрО РАН за помощь и поддержку на всех этапах выполнения диссертационного исследования, сотрудникам ЦКП «Молекулярная биология» – за помощь в проведении и обработке данных молекулярно-генетического анализа.

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во **Введении** обоснована актуальность темы диссертационной работы, сформулированы основные цели и задачи исследования, научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы.

### ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

На основе анализа данных отечественной и зарубежной литературы дана общая характеристика радиационного и химического факторов (в частности тяжёлого металла Cd), рассмотрены механизмы их действия. Обобщены данные о биологических реакциях дождевых червей в условиях радиоактивного и химического загрязнения среды обитания. Обсуждаются возможные механизмы приспособления организмов к существованию в условиях загрязнения среды обитания.

### ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Экспериментальные участки** выбраны в окрестностях пос. Водный (Ухтинский район, Республика Коми), где в течение 25 лет осуществлялась промышленная



добыча радия из пластовых вод и привозных отходов урановой промышленности (участки 1, 2), и на незагрязнённой ТЕРН и ТМ территории (участки 3, 4). Участки расположены в сходных природно-климатических условиях, характеризуются почвами подзолистого типа и разнотравно-злаковой растительностью. В качестве **объектов исследования** выбраны дождевые черви семейства Lumbricidae – *Aporrectodea caliginosa* и *Lumbricus rubellus* из природной популяции.

**Секвенирование фрагмента последовательности гена митохондриальной цитохромоксидазы I** [Folmer et al., 1994] использовали для подтверждения видовой принадлежности дождевых червей. Для обработки и анализа последовательностей применяли пакет программ MEGA 5.0.

**Оценка уровня повреждений ДНК.** У дождевых червей из природной популяции определяли исходный, т.е. без дополнительного воздействия, уровень повреждений ДНК. Скорость репарации ДНК оценивали после облучения в дозе 4 Гр («Исследователь»,  $^{137}\text{Cs}$ ,  $P_\gamma = 0.7$  Гр/мин) через 1, 5, 30, 60 и 240 минут после окончания воздействия. Уровень повреждений ДНК после дополнительного воздействия Cd оценивали при концентрации 425 мг/кг почвы. Уровни повреждений ДНК определяли с помощью щелочной и/или нейтральной версий метода ДНК-комет [Tise et al., 2000] с некоторыми модификациями. Значимость различий средних значений по показателю «% ДНК в хвосте» в выборках оценивали с помощью *t*-критерия Стьюдента.

Для **оценки репродуктивной способности** по 2 половозрелых особи содержали в контейнерах с искусственным субстратом (8–9 повторностей для участка) в течение 3 месяцев. Оценку осуществляли по распределению частоты встречаемости коконов среди всех повторностей для каждого участка и морфометрическим показателям коконов (длина, диаметр, объём кокона). Значимость различий оценивали с помощью критерия Манна-Уитни.

**Оценка выживаемости после облучения.** Дождевых червей помещали в контейнеры, содержащие 18 г лабораторной почвы, и облучали в дозе 2270 Гр («Исследователь»,  $^{137}\text{Cs}$ ,  $P_\gamma = 0.7$  Гр/мин), затем культивировали в контейнерах с лабораторной почвой ( $m = 1$  кг). Необлучённых особей использовали в качестве контроля. Количество выживших червей регистрировали в течение 30 дней после воздействия. По полученным данным строили кривые выживаемости по методу Каплана-Мейера в программе STATISTICA 6.0. Значимость различий оценивали по критерию Мантела-Кокса.

**Оценка выживаемости после дополнительного воздействия Cd.** В почвенный субстрат токсикант вносили в виде раствора  $\text{CdCl}_2$  и тщательно перемешивали полученную смесь. Для стабилизации состава контейнеры с почвой выдерживали в течение суток при комнатной температуре (20–22 °С). Выживаемость дождевых червей оценивали по окончании эксперимента после воздействия 0 и 1100 мг/кг Cd в течение 164 дней. Указанная выше концентрация Cd в почве была достигнута в результате постепенного увеличения в каждом импактном варианте в период с 31 по 73 день воздействия исходной концентрации 325 мг Cd/кг на 125, 200, 200 и 250

мг Cd/кг. Смертность особей определяли путём подсчёта выживших дождевых червей в каждом контейнере. Значения полумлетальных концентраций Cd ( $LD_{50}$ ) рассчитывали по формуле Г. Н. Першина [Беленький, 1963]. По полученным данным строили кривые выживаемости, как описано выше.

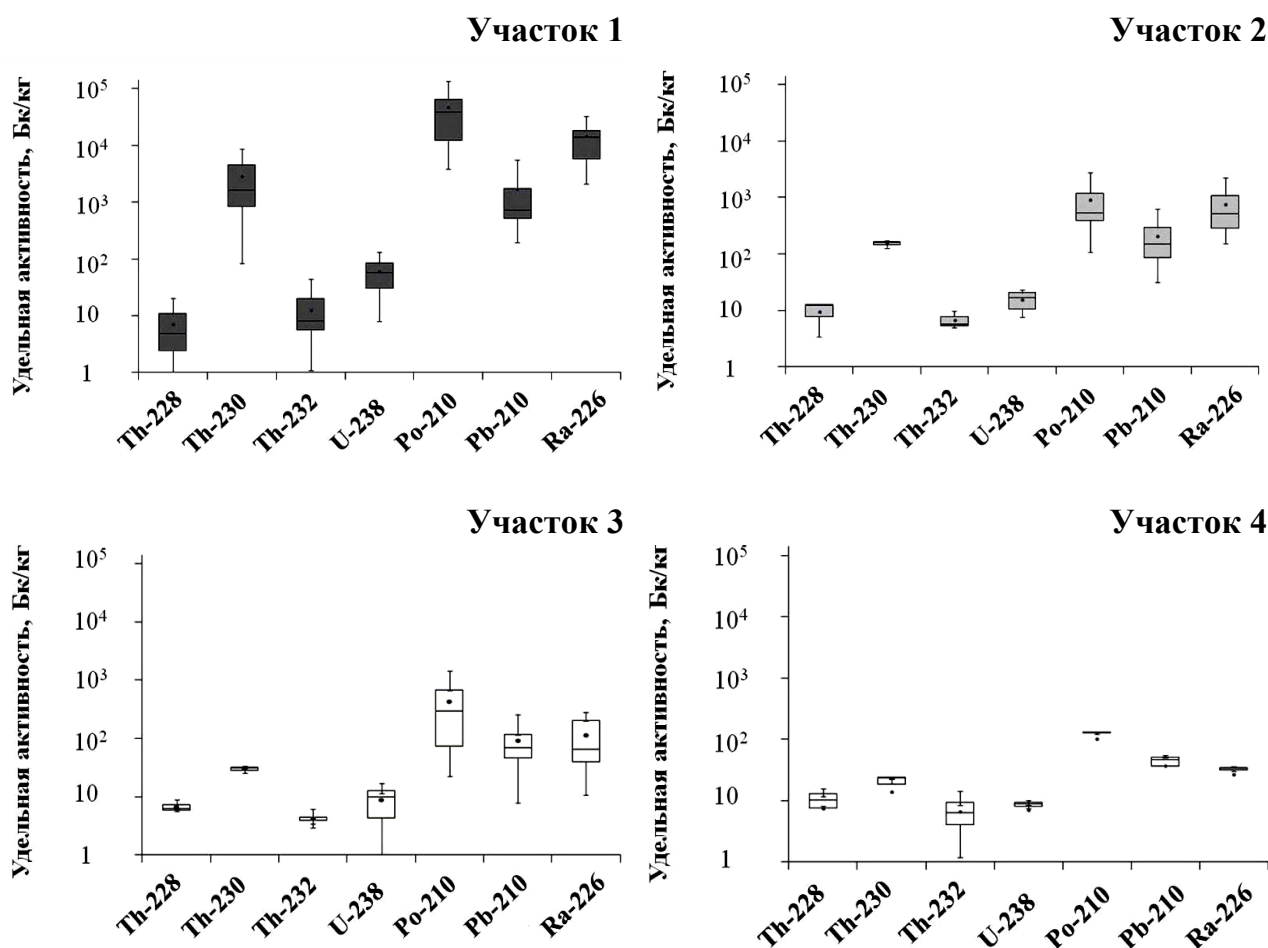
**Оценка плотности популяции.** Для определения плотности популяции дождевых червей сем. Lumbricidae животных вручную отбирали из почвенных монолитов размером  $0.25 \times 0.25 \times 0.25$  м с импактных участков 1, 2 и фонового участка 3. Затем общее количество червей пересчитывали в единицу «экземпляров на  $m^2$ » (экз./ $m^2$ ). Значимость корреляции между плотностью популяции и физико-химическими факторами оценивали по критерию Манна-Уитни.

**Оценку генетического полиморфизма популяции** провели с применением анализа полиморфизма длин амплифицированных фрагментов (AFLP). ДНК разрезали с помощью двух эндонуклеаз рестрикции *EcoRI* и *Tru9I* (изошизомер *MseI*). Двунитевые адаптеры лигировали к концам ДНК фрагментов, образуя основу для последующей ПЦР амплификации (за преселективной следует селективная). Рестриксию и лигирование провели одновременно в одной реакции [Vos et al., 1995]. Дальнейший анализ по разделению фрагментов проводили на генетическом анализаторе ABI Prism 3500. Итоговые хроматограммы анализировали с помощью программы GeneMapper 4.0. Для анализа результатов AFLP использовали дискриминантный анализ главных компонент (DAPC) в программе R [Jombart, 2008], байесовский кластерный анализ в программе STRUCTURE [Pritchard et al., 2000; Rosenberg et al., 2002], онлайн-сервис CLUMPAK [Kopelman et al., 2015, <http://clumpak.tau.ac.il>], надстройку GenAlex 6.5 для MS Excel [Peakall, Smouse, 2012].

**Расчёт дозовых нагрузок.** Мощности поглощённых доз для дождевых червей, обусловленные облучением от  $^{238}\text{U}$ ,  $^{230}\text{Th}$ ,  $^{226}\text{Ra}$ ,  $^{210}\text{Po}$ ,  $^{210}\text{Pb}$ ,  $^{232}\text{Th}$ ,  $^{228}\text{Th}$ , рассчитывали в программном комплексе ERICA Assessment Tool Version 1.3 [Brown et al., 2008] и методики, предложенной в работе [Thomas, Liber, 2001]. Для расчетов использовали вычисленные в программе ERICA Tool удельные активности ТЕРН в организме червей на основании содержаний ТЕРН в почвах участков с учетом коэффициентов накопления (КН). Коэффициенты качества:  $\alpha = 10$ ,  $\beta$  низкой энергии = 3,  $\beta$  высокой энергии и  $\gamma = 1$  [Chambers et al., 2006].

### ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

**Содержание радионуклидов.** Почвы импактного участка 1 характеризуются наиболее высокими концентрациями  $^{226}\text{Ra}$ ,  $^{210}\text{Po}$ ,  $^{210}\text{Pb}$ : среднее содержание  $^{226}\text{Ra}$  на участке 1 выше значений этого показателя для 2, 3 и 4 участков в 19, 122 и 429 раз (Рисунок 1). В почвах участка 2 отмечены более высокие, чем фоновые, удельные активности  $^{226}\text{Ra}$  и его дочерних изотопов  $^{210}\text{Po}$  и  $^{210}\text{Pb}$  (Рисунок 1). Мощность амбиентного эквивалента дозы  $\gamma$ -излучения в воздухе фоновых участков не отличается от средних многолетних значений для данного региона и варьирует от 0.08 до 0.12 мкЗв/ч.

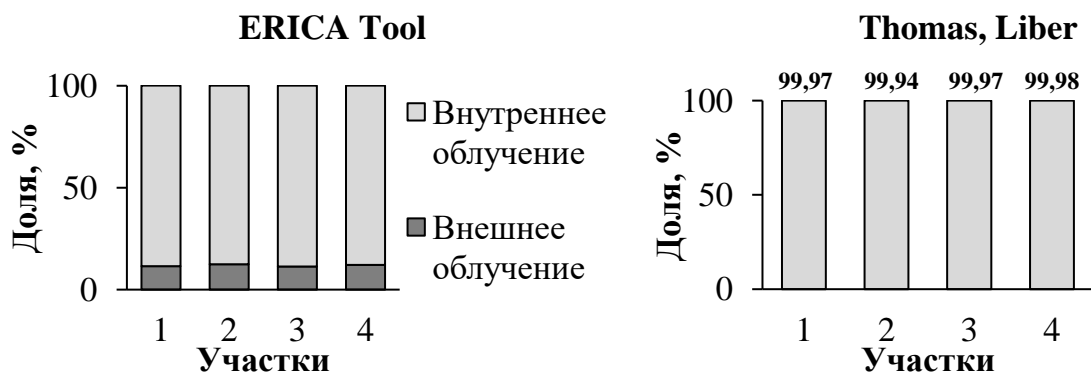


**Рисунок 1** – Удельные активности радионуклидов (Бк/кг) в почвах импактных (1, 2) и фоновых (3, 4) участков

**Концентрации тяжёлых металлов и СПЗ.** Степень опасности загрязнения почвы тяжёлыми металлами оценивали по суммарному показателю загрязнения ( $Z_c$ ). В почвах импактного участка 1 концентрации ТМ (Cu, Pb, Cd, Zn, Cr, As, Hg, Ni, Co) выше, чем эти значения на импактном участке 2 и фоновых участках 3 и 4. Почвы участка характеризуются концентрациями ТМ, повышенными в 2–65 раз относительно фоновых региональных значений ( $Z_c = 108$ ). Концентрации ТМ в почвах участка 2 больше значений регионального фона в 2–7 раз и превышают соответствующие значения для почв фоновых участков 3 и 4 ( $Z_c = 21$ ). В почвах фоновых участков 3 и 4  $Z_c = 2–3$ .

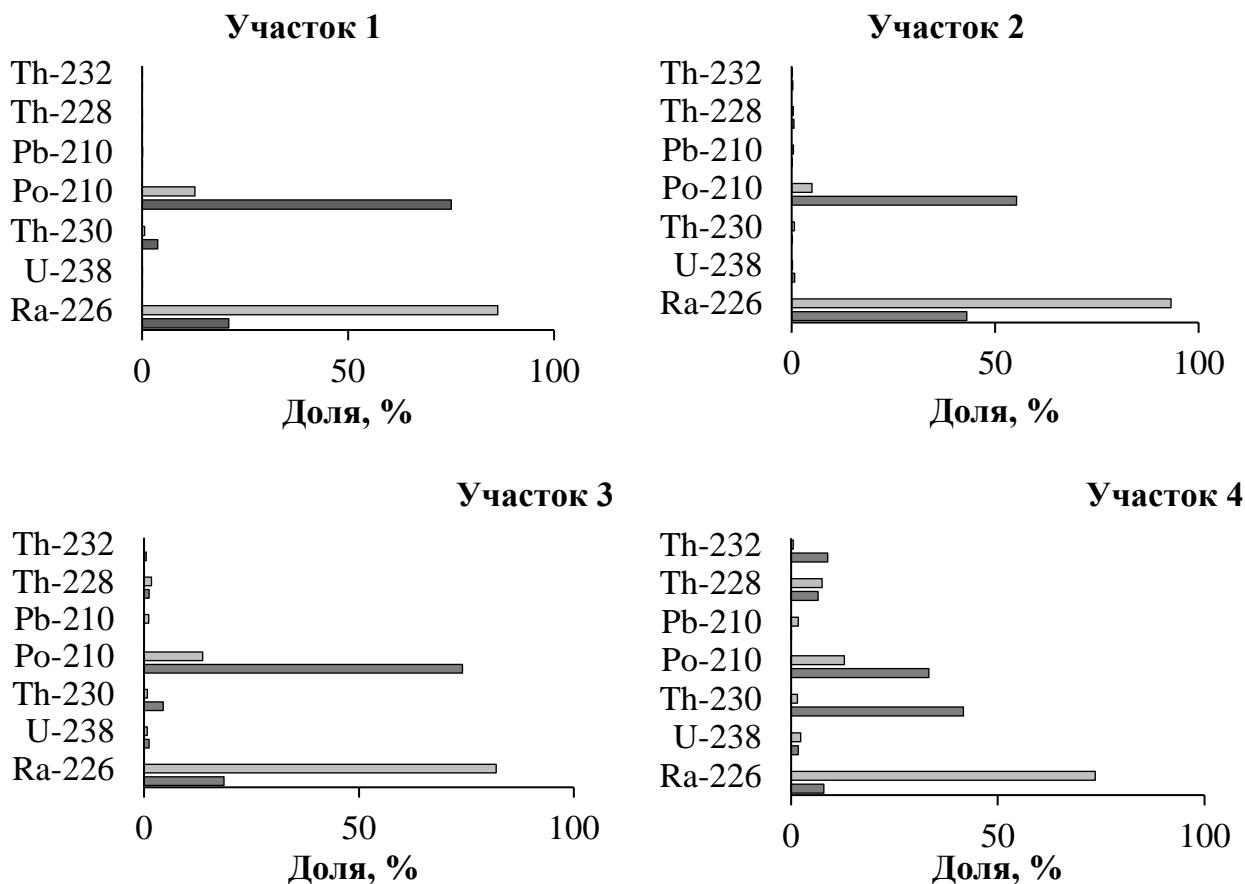
**Дозовые нагрузки на дождевых червей.** Дозовые нагрузки от естественных радионуклидов на дождевых червей с фоновых и импактных участков, рассчитанные в программе ERICA Tool, составили 0.3-1 и 6-113 мкГр/ч соответственно; по методике Thomas, Liber (2001) значения составили 1.0-1.5 и 4.3-161 мкГр/ч на фоновых и загрязнённых участках соответственно.

Вклад внутреннего облучения в суммарную дозовую нагрузку на червей составляет 87–88% по ERICA Tool, свыше 99% – по Thomas, Liber (Рисунок 2).



**Рисунок 2** – Вклад внешнего и внутреннего облучения в суммарную дозовую нагрузку на дождевых червей по двум дозиметрическим моделям (ERICA Tool и Thomas, Liber (2001))

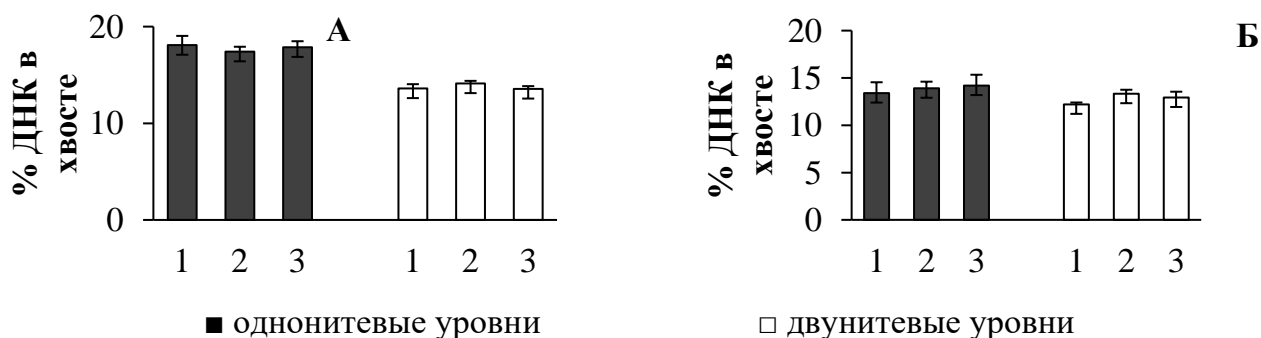
По ERICA Tool основными дозообразующими радионуклидами являлись, главным образом,  $^{226}\text{Ra}$ , а также  $^{210}\text{Po}$  (Рисунок 3). Вклад в дозы облучения от  $^{210}\text{Pb}$ , изотопов Th,  $^{238}\text{U}$  минимален на импактных участках с нарушенным равновесием в радиоактивных рядах. Напротив, оценка по методике Thomas, Liber (2001) показала, что главными дозообразующими радионуклидами являются, в первую очередь,  $^{210}\text{Po}$  и потом  $^{226}\text{Ra}$ . Вклад  $^{210}\text{Pb}$ ,  $^{230}\text{Th}$ ,  $^{238}\text{U}$  незначителен (Рисунок 3).



**Рисунок 3** – Вклад радионуклидов в суммарную дозовую нагрузку, %. Темные столбцы – ERICA Tool, светлые столбцы – методика Thomas, Liber (2001)

**Видовая принадлежность дождевых червей.** Полученные последовательности COI для 9 исследуемых образцов зарегистрированы в генетической базе данных (GenBank) национального центра биотехнологической информации (NCBI, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) (KJ595804-KJ595811, KJ561857) и подтверждают принадлежность дождевых червей к видам *A. caliginosa* и *L. rubellus*.

**Уровни повреждений ДНК** у дождевых червей *A. caliginosa* и *L. rubellus*, обитающих на импактных участках 1 и 2, статистически значимо не отличались от соответствующих уровней у животных с фонового участка 3 (Рисунок 4).



**Рисунок 4** – Уровни однонитевых и двунитевых повреждений ДНК дождевых червей *A. caliginosa* (А) и *L. rubellus* (Б), населяющих загрязнённые (1 и 2) и фоновый (3) участки

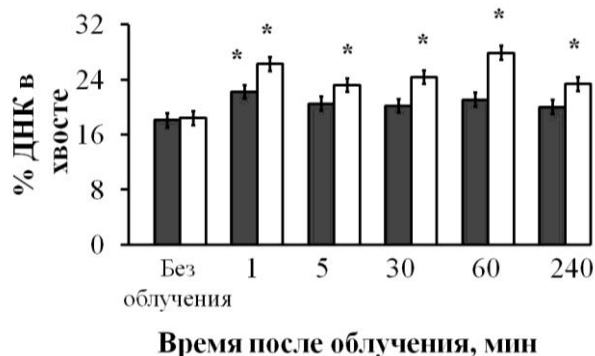
**Скорость репарации ДНК.** Облучение дождевых червей *A. caliginosa* с участка 3 в дозе 4 Гр индуцировало статистически значимо повышенные относительно исходного уровня повреждения ДНК спустя 1 ( $p = 0.001$ ), 5 ( $p = 0.003$ ), 30 ( $p = 0.0004$ ), 60 ( $p = 0.0002$ ) и 240 минут ( $p = 0.02$ ) после облучения. Дополнительные повреждения ДНК после облучения в дозе 4 Гр зафиксированы для дождевых червей *A. caliginosa* с участка 1 сразу же после облучения ( $p = 0.017$ ). Уровни повреждений ДНК через 5, 30, 60 и 240 мин после облучения значимо ( $p < 0.05$ ) не отличались от исходного уровня повреждений (Рисунок 5).

Следовательно, для полной репарации повреждений ДНК дождевых червей с фонового участка 3 необходимо гораздо больше времени, чем в случае особей с импактного участка.

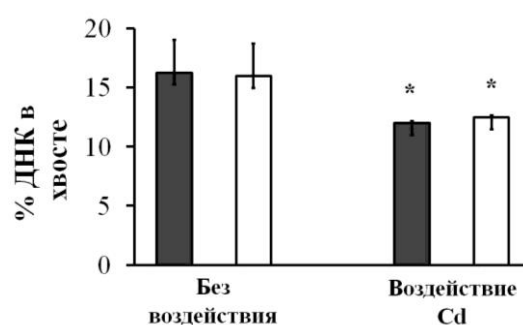
**Уровни повреждения ДНК после воздействия Cd.** Уровни однонитевых повреждений ДНК дождевых червей с разных участков после воздействия Cd статистически значимо не отличались, однако оказались значимо ( $p < 0.05$ ) ниже спонтанных уровней повреждения ДНК, определённых в предыдущем эксперименте (Рисунок 6).

**Репродуктивная способность дождевых червей *A. caliginosa*** с фонового участка 3, оценённая по распределению частот встречаемости определённого числа коконов в повторности за все время эксперимента оказалась значимо выше ( $p = 0.019$ ), чем значение этого показателя для животных с загрязнённого ТЕРН и ТМ участка 1 (Рисунок 7). За время эксперимента с наибольшей частотой отсутствие коконов наблюдалось у дождевых червей с импактного участка 1 по сравнению с

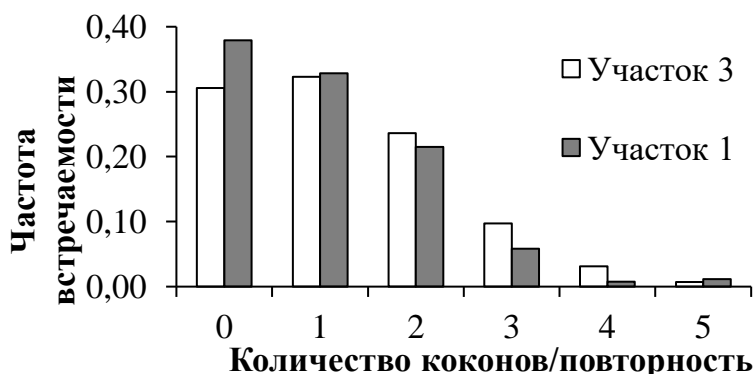
особями с фонового участка 3, а образование 2–4 коконов оказалось выше у почвенных беспозвоночных с фоновой территории (Рисунок 7).



**Рисунок 5** – Уровни однонитевых повреждений ДНК дождевых червей *A. caliginosa*, зафиксированные через 1, 5, 30, 60 и 240 минут после облучения в дозе 4 Гр. \* – статистически значимые отличия от уровня без облучения



**Рисунок 6** – Уровни повреждений ДНК дождевых червей *A. caliginosa* после воздействия 425 мг Cd/кг. \* – статистически значимые отличия от уровней повреждений без воздействия Cd ( $p < 0.05$ )



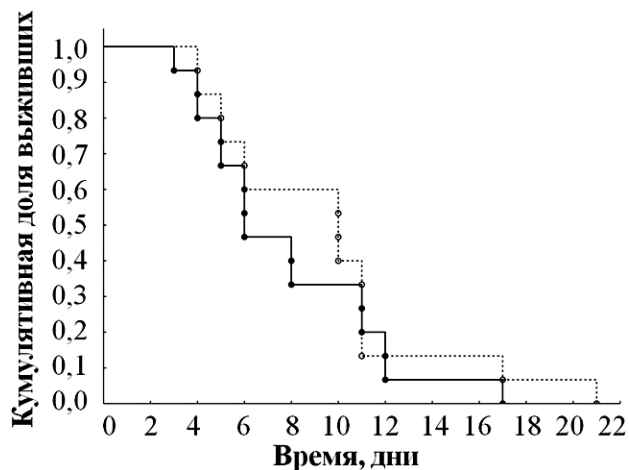
**Рисунок 7** – Распределение частот встречаемости определённого числа коконов в повторности

Различий в значениях морфометрических показателей коконов не найдено: объёмы коконов на импактном и фоновом участках значимо не отличались друг от друга:  $0.2153 \pm 0.0017$  и  $0.2147 \pm 0.0019$  см<sup>3</sup>.

**Выживаемость после острого облучения.** Выживаемость дождевых червей, не подвергнутых дополнительному облучению, составила 100%. Анализ продолжительности жизни червей *A. caliginosa* с фонового и загрязнённого участков не выявил статистически значимых различий в устойчивости к облучению в дозе 2270 Гр (Рисунок 8). Выявлена тенденция к большей продолжительности жизни особей с импактного участка 1 по сравнению с животными с фонового участка 3 – 21 и 17 дней соответственно. После облучения в дозе 2270 Гр гибель 50% особей с контрольного участка фиксировали на 6-й день, с загрязнённого – на 10-й день наблюдения.

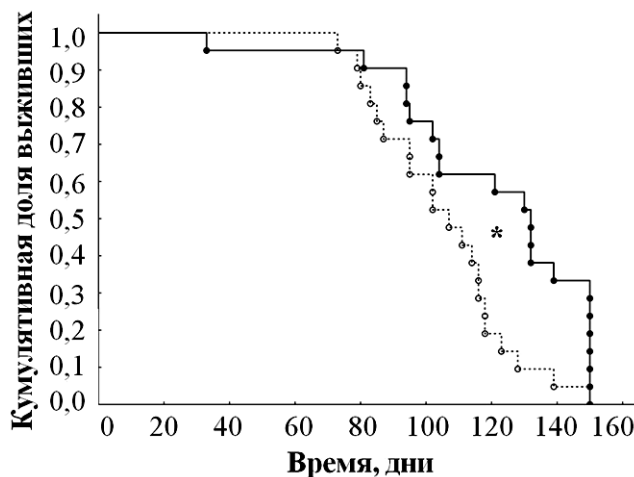
**Выживаемость после дополнительного воздействия Cd.** Дождевые черви *A. caliginosa* с участка 1 оказались чувствительнее к действию Cd, чем особи с участка 3 (Рисунок 9). Рассчитанные по формуле Г. Н. Першина значения полумлетальных

доз (ЛД<sub>50</sub>) Cd при многократном внесении в почву для дождевых червей с импактного участка 1 оказались ниже значений, полученных по данным выживаемости особей с фонового участка 3, что указывает на их бóльшую чувствительность к действию Cd: ЛД<sub>50</sub> для особей *A. caliginosa* с участка 1 – 605 мг/кг, с участка 3 – 883 мг/кг.



— особи с участка 3

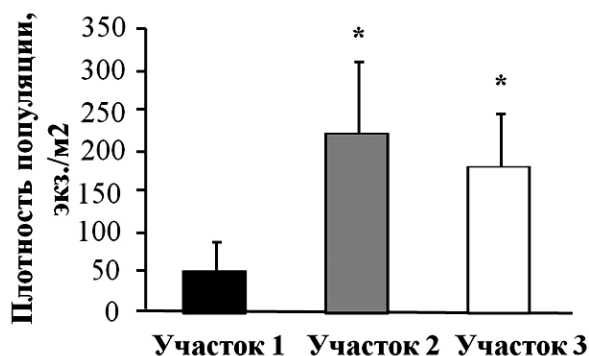
**Рисунок 8** – Выживаемость *A. caliginosa* после облучения в дозе 2270 Гр



..... особи с участка 1

**Рисунок 9** – Кривые выживаемости дождевых червей *A. caliginosa* после воздействия Cd в концентрации 1100 мг/кг. \* – различия статистически значимы при  $p = 0.007$

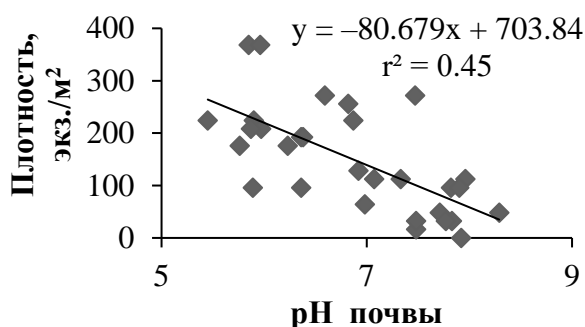
**Плотность популяции дождевых червей** на исследуемых участках варьировала от 51 до 221 экз./м<sup>2</sup>. Плотность популяции почвенной мезофауны на импактном участке 1 оказалась статистически значимо ( $p < 0.001$ ) ниже, чем соответствующие значения для импактного участка 2 и фонового участка 3 (Рисунок 10).



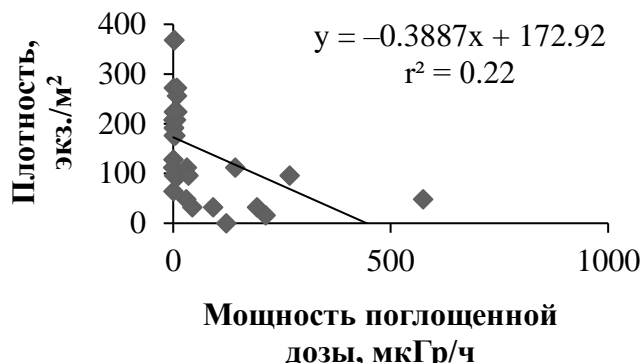
**Рисунок 10** – Плотность популяции дождевых червей (экз./м<sup>2</sup>) на участках с разным уровнем техногенного загрязнения. \* – статистически значимое отличие от участка 1 ( $p < 0.001$ )

Корреляционно-регрессионный анализ показал, что между численностью и рН почвы существует обратная корреляция ( $r = -0.67$ ,  $p = 0.002$ ), указывающая на то, что чем выше щёлочность почвы, тем меньше численность особей. Параметры линейной модели для описания зависимости между двумя данными факторами следующие:  $r^2 = 0.45$ ,  $F = 22.9919$ ,  $p = 0.000049$  (Рисунок 11). Аналогичным образом установлена слабая обратная корреляция между численностью и мощностью

поглощённой дозы ( $r = -0.47$ ,  $p = 0.002$ ), что указывает на снижение численности при повышении мощности поглощенной дозы. Однако линейная модель объясняет слишком малую долю изменчивости экспериментальных данных, поскольку  $r^2 < 0.5$  ( $r^2 = 0.22$ ) (Рисунок 12).



**Рисунок 11** – Зависимость плотности популяции от рН водной вытяжки почвы



**Рисунок 12** – Зависимость плотности популяции от мощности поглощённой дозы

**Генетический полиморфизм популяции в условиях радиоактивного и химического загрязнения почвы.** Ожидаемая гетерозиготность между выборками *A. caliginosa* со всех участков статистически значимо не отличалась. Среднее значение  $N_e$  по всем выборкам составило  $0.116 \pm 0.004$ , что указывает на низкую степень генетического разнообразия популяции (Таблица 1).

**Таблица 1** – Основные показатели генетической изменчивости дождевых червей *A. caliginosa* с экспериментальных участков

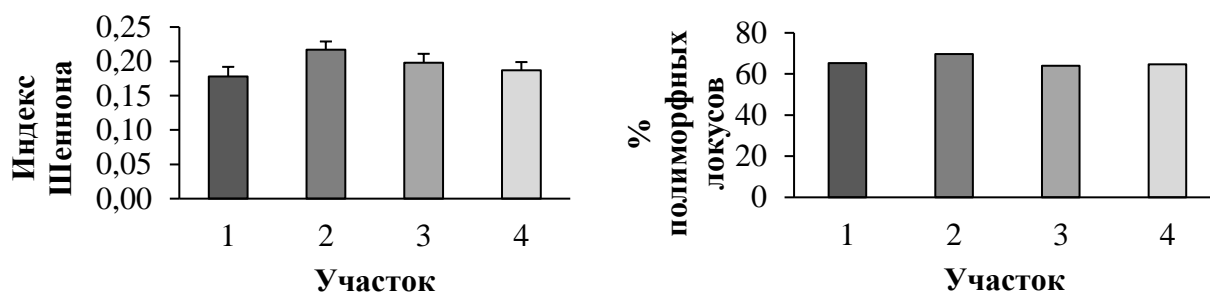
Участок	$N_e$	$N_e$	$N_p$ (%)
1	$0.103 \pm 0.008$	$1.147 \pm 0.013$	25 (8.3)
2	$0.130 \pm 0.009$	$1.193 \pm 0.015$	29 (9.7)
3	$0.120 \pm 0.009$	$1.185 \pm 0.016$	23 (7.7)
4	$0.110 \pm 0.008$	$1.165 \pm 0.015$	14 (4.7)
$M \pm SE^*$	$0.116 \pm 0.004$	$1.173 \pm 0.007$	$22.75 \pm 2.19$ (7.6)

\* – Среднее значение  $\pm$  ошибка среднего.  $N_e$  – ожидаемая гетерозиготность,  $N_e$  – число эффективных аллелей,  $N_p$  – число уникальных аллелей

Наибольшая доля редких аллелей  $N_p$  (фрагментов рестрикции, полученных методом AFLP) выявлена для *A. caliginosa* с импактных участков 1 и 2 (8.3 и 9.7%), а наименьшая – для особей с фонового участка 4 (4.7%). Средние значения индекса Шеннона и процента полиморфных локусов по всем участкам составляют  $0.20 \pm 0.01$  и  $66 \pm 2\%$ . Значения показателей для каждого участка представлены на рисунке 13.

**Генетические расстояния ( $D_N$ ).** Исследование генетического разделения выборок *A. caliginosa* по степени генетической дифференциации показало высокую генетическую идентичность ( $I_n$ ) всех групп дождевых червей ( $I_n = 0.992-0.995$ ,  $D_N = 0.005-0.008$ ), что указывает на принадлежность этих групп к одной популяции *A. caliginosa*.





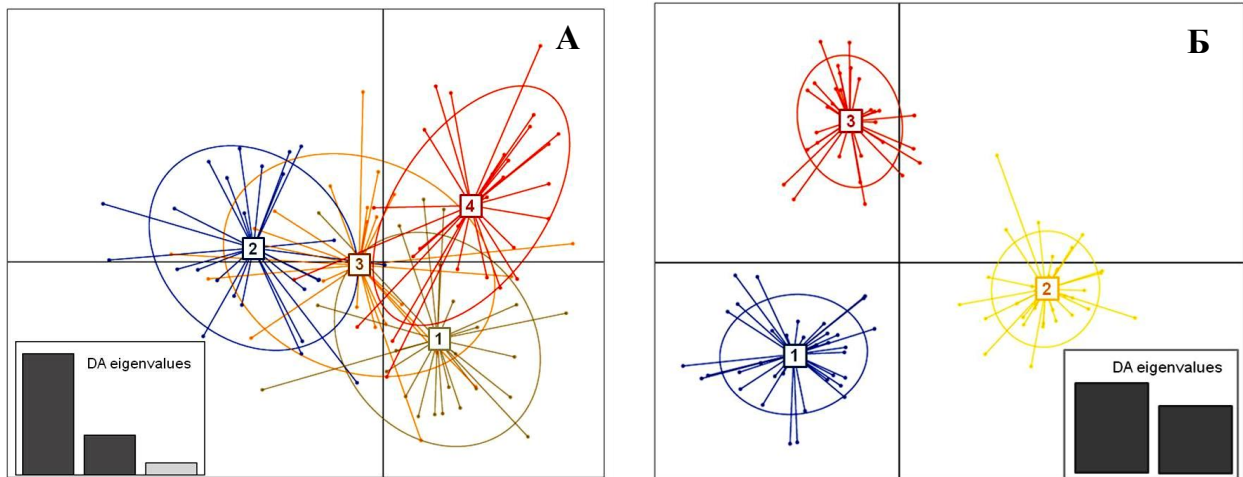
**Рисунок 13** – Показатели генетического разнообразия *A. caliginosa* с исследуемых участков

Зависимость между географическим и генетическим расстоянием так же, как взаимосвязь между генетическим расстоянием, pH почвы и концентрациями не выявлена (Таблица 2).

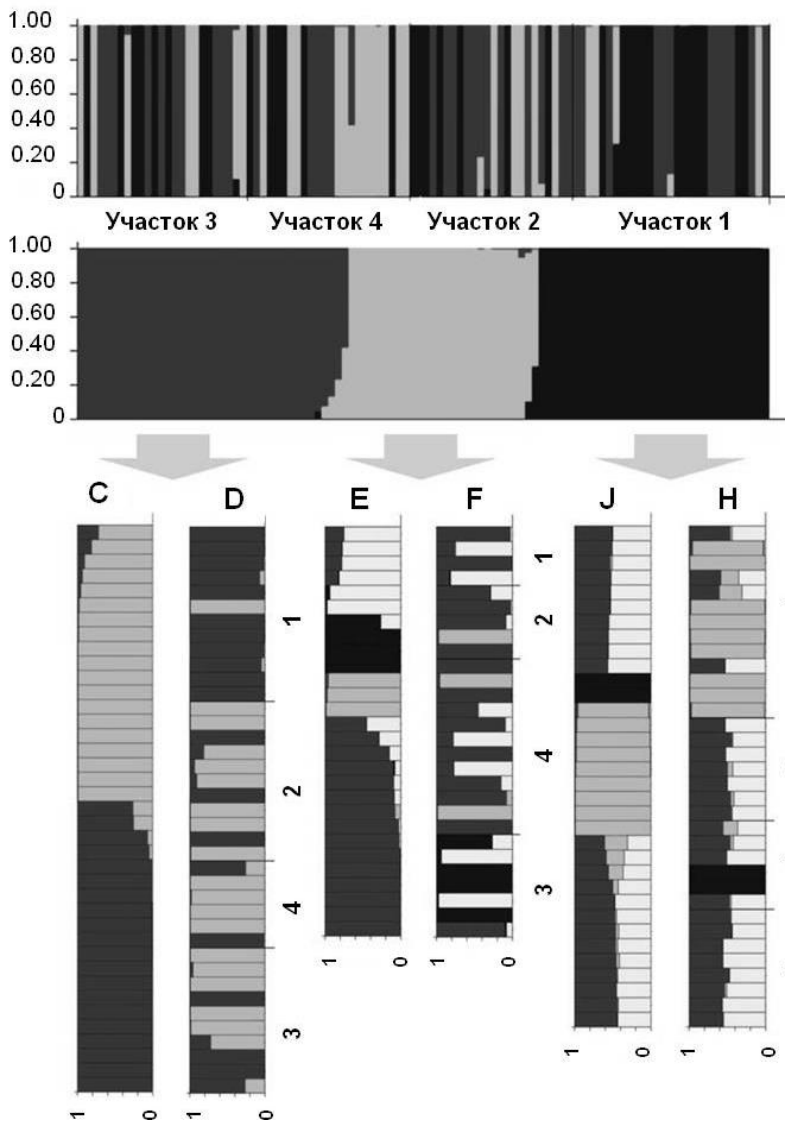
**Таблица 2** – Коэффициенты корреляции между коэффициентом генетической дистанции ( $D_N$ ), географическим расстоянием ( $D_G$ ), pH и основными загрязнителями почвы (тест Мантела)

	$D_G$	pH	$^{226}\text{Ra}$	$^{238}\text{U}$	$^{230}\text{Th}$	$^{210}\text{Po}$	$^{210}\text{Pb}$	Cu	Pb	Cd	As	Hg
$D_N$	-0.027	0.006	-0.047	0.025	0.085	-0.033	-0.006	0.073	0.063	0.067	0.09	0.032

**Генетическая структура популяции.** Анализ генетической структуры выборок дождевых червей *A. caliginosa*, учитывающий первоначальную информацию об участках, показал, что все индивидуумы (точки) не группируются в кластеры, а располагаются в хаотичном порядке по всему полю диаграммы рассеяния (Рисунок 14). Следовательно, уровень техногенного загрязнения почвы не вызывает дифференциацию генетической структуры исследуемых выборок (Рисунок 14). По результатам дисперсионного анализа AMOVA 97% молекулярной изменчивости групп дождевых червей *A. caliginosa* приходится на изменчивость внутри групп (внутрипопуляционная изменчивость), а генетическая изменчивость между группами (межпопуляционная изменчивость) минимальна – 3% ( $p = 0.001$ ). Именно ввиду низкой межгрупповой изменчивости мы не наблюдали разделения по генетической структуре между группами дождевых червей *A. caliginosa* на диаграмме рассеяния. Распределение образцов по значению критерия Q показало, что все индивидуумы дифференцируются на три группы ( $K = 3$ ) (Рисунок 14Б), которые не связаны с участками их происхождения (Рисунок 14А). Визуализация результатов подтвердила ранее определённое разделение индивидуумов *A. caliginosa* со всех участков на три кластера. Доля изолированных кластеров внутри каждого экспериментального участка оказалась различной, что может говорить о сложной внутривидовой генетической структуре выборок *A. caliginosa*. В результате отдельного анализа каждого из выявленных кластеров (Рисунок 15 С-Н) обнаружено, что каждый из трёх кластеров, определённых на первой стадии анализа, характеризуется высоким уровнем генетического разнообразия и содержит субкластеры, распределение которых не соответствует происхождению образцов.



**Рисунок 14** – Диаграммы рассеяния на основании 13 главных компонент, определённых методом DAPC и полученных: а) с информацией о местах обитания дождевых червей; 1, 2, 3, 4 – участки сбора особей; б) без предварительной информации; 1, 2, 3 – кластеры, которые не связаны с участками сбора червей



**Рисунок 15** – Оценённая в STRUCTURE генетическая структура групп *A. caliginosa*. Каждый индивидуум представлен вертикальной (А и В) или горизонтальной (С-Н) полосой, которая поделена на К сегментов, представляющих оцененный вклад каждого индивидуума в К (Q) кластеры. Оттенки серого цвета указывают на разные кластеры.

А – особи разделены по экспериментальным участкам.

В – особи разделены по критерию Q.

С, Е, J – результаты второго уровня оценки структуры в соответствии с кластерами, полученными на основе анализа особей со всех участков (В), разделенных по критерию Q.

Д, F, H – результаты, полученные разделением особей по экспериментальным участкам

## ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Полученные в диссертации результаты сопоставлены с имеющимися в российской и зарубежной литературе данными о реакциях почвенных беспозвоночных в условиях радиоактивного и химического загрязнения почвы, обсуждены возможные механизмы, обеспечивающие устойчивое существование популяции дождевых червей семейства Lumbricidae в загрязнённой радионуклидами и тяжёлыми металлами среде.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Изучение действия радиационного и химического факторов на природные популяции растений и животных является актуальной задачей экотоксикологических и радиоэкологических исследований. В настоящее время существует недостаток знаний о сочетанном действии факторов разной природы на биоту, в особенности в отношении адаптивных механизмов, лежащих в основе устойчивого существования организмов и сохранения популяции в условиях загрязнения среды обитания. Дождевые черви – типичные представители почвенной фауны, испытывающие как внешнее, так и внутреннее воздействие поллютантов. Именно поэтому диссертационное исследование пролонгированного влияния повышенных концентраций ТЕРН и ТМ в почве на дождевых червей из природных популяций позволяет внести существенный вклад в устранение пробела в данной области научных исследований.

В работе показано, что дождевые черви из популяции с низкой плотностью в условиях значительного радиоактивного и химического загрязнения почвы характеризуются пониженной репродуктивной способностью, играющей важную роль в поддержании жизнеспособности популяции. Уровни повреждения ДНК беспозвоночных, испытывающих хроническое действие ТЕРН и ТМ, не превышают таковые у особей с фонового участка, что, возможно, свидетельствует об адаптации особей к стрессовому воздействию. Острое облучение в дозе 4 Гр позволило выявить адаптивный ответ у особей с техногенно загрязнённой территории в виде повышенной скорости репарации ДНК, что является важной защитной реакцией на повреждение ДНК после радиоактивного и химического воздействия. Эксперименты по оценке степени повреждения ДНК не зафиксировали адаптивных проявлений у почвенных беспозвоночных *A. caliginosa* после дополнительного воздействия высоких концентраций Cd, а в случае выживаемости, наоборот, выявлена повышенная чувствительность *A. caliginosa*. Показано, что степень загрязнения почвы ТЕРН (УА ( $^{226}\text{Ra}$ ) = 33–14399 Бк/кг и ТМ ( $Z_c = 2-108$ )) не влияет на генетический полиморфизм в популяции червей *A. caliginosa*.

Таким образом, при изучении влияния хронического радиационного и химического воздействия на дождевых червей наиболее чувствительными показателями оказались уровень повреждений ДНК, репродуктивная способность особей и связанная с ней плотность популяции. Однако сложная внутривидовая структура *A. caliginosa*, а также давление множества других факторов окружающей среды затрудняют анализ результатов оценки генетического разнообразия популяции Lumbricidae и прогнозирование уровней загрязнения почвы, не оказывающих негативного

влияния на почвенных беспозвоночных.

## ВЫВОДЫ

1. Экспериментальные участки вблизи пос. Водный (Ухтинский район, Республика Коми) по результатам физико-химического анализа почвы и измерения радиационного фона характеризуются контрастными уровнями загрязнения радионуклидами и тяжёлыми металлами: участок 1 – 2.5–10.5 мкЗв/ч, СПЗ = 108; участок 2 – 0.1–5.4 мкЗв/ч, СПЗ = 21; участки 3 и 4 – 0.08–0.12 мкЗв/ч, СПЗ = 2–3, соответственно.

2. Рассчитанные по предложенным в работах (Brown et al., 2008) и (Thomas, Liber, 2001) дозиметрическим моделям мощности доз хронического облучения дождевых червей в среде обитания варьировали от 0.3 до 113 и от 1 до 161 мкГр/ч, соответственно.

3. Уровни повреждений ДНК дождевых червей *A. caliginosa* и *L. rubellus*, собранных на участках, контрастных по содержанию ТЕРН и ТМ, не отличались между видами и между участками.

4. Острое  $\gamma$ -облучение в дозе 4 Гр позволило выявить адаптивный ответ у особей *A. caliginosa* с загрязнённого участка 1 в виде повышенной скорости репарации ДНК, что является важной защитной реакцией на повреждение ДНК после радиационного и химического воздействия. После дополнительного воздействия 425 мг Cd/кг почвенного субстрата уровни повреждений ДНК червей *A. caliginosa* с загрязнённого участка 1 и фонового участка 3 не отличались.

5. Адаптивная реакция дождевых червей *A. caliginosa* из популяций, испытывающих хроническое воздействие ТЕРН и ТМ, на острое действие ионизирующего излучения в дозе 2270 Гр по показателю выживаемости не обнаружена. Дополнительное воздействие Cd на выживаемость животных показало бóльшую чувствительность дождевых червей *A. caliginosa* с импактного участка 1 по сравнению с особями фонового участка 3 (1110 мг Cd/кг,  $p = 0.007$ ).

6. Общая плотность популяции дождевых червей на импактном участке 1 оказалась статистически значимо ( $p < 0.001$ ) ниже, чем соответствующие значения для червей с импактного участка 2 и фонового участка 3, при пониженной ( $p = 0.019$ ) репродуктивной способности *A. caliginosa*. Также выявлено статистически значимое снижение численности дождевых червей при увеличении рН почвы ( $r = -0.67$ ,  $p = 0.002$ ) и мощности поглощённой дозы ( $r = -0.47$ ,  $p = 0.002$ ).

7. Радиоактивное и химическое загрязнение почвы в изученном диапазоне концентраций не влияет на генетическое разнообразие и генетическую дифференциацию исследованных групп *A. caliginosa* ввиду высокой внутригрупповой генетической изменчивости (97%,  $p = 0.001$ ). Генетическая структура популяции дождевых червей в пределах исследованной территории характеризуется наличием трёх генетических кластеров (линий).

## СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

### *В изданиях, рекомендованных ВАК:*

1. Канева (Рыбак), А.В. Уровень повреждений и скорость репарации ДНК в клетках дождевых червей из популяций, длительное время обитающих в почве с повышенным содержанием радионуклидов / А.В. Канева (Рыбак), Е.С. Белых, Т.А. Майстренко, Д.М. Шадрин, Я.И. Пылина, И.О. Велегжанинов // Радиационная биология. Радиоэкология. – 2015. – Т. 55. – № 1. – С. 24–34.
2. Белых, Е.С. Видовое разнообразие растительных сообществ на территориях, антропогенно загрязненных тяжелыми естественными радионуклидами / Е.С. Белых, Т.А. Майстренко, Б.И. Груздев, О.М. Вахрушева, А.В. Канева (Рыбак), А.В. Трапезников, В.Г. Зайнуллин // Экология. – 2015. – № 5. – С. 354–360.
3. Maystrenko, T. The succession of the plant community on a decontaminated radioactive meadow site / T. Maystrenko, B. Gruzdev, E. Belykh, A. Rybak // Journal of Environmental Radioactivity. – V. 192. – 2018. – P. 687–697.
4. Gruzdev, B. The list of species registered in taiga meadow community during succession under enhanced radioactive background / B. Gruzdev, T. Maystrenko, E. Belykh, A. Rybak // Data in Brief. – V. 19. – 2018. – P. 145–155.
5. Rybak, A.V. Genetic analysis in earthworm population from area contaminated with radionuclides and heavy metals / A.V. Rybak, E.S. Belykh, T.A. Maystrenko, D.M. Shadrin, Y.I. Pylina, I.F. Chadin, I.O. Velegzhaninov // The Science of the Total Environment. – 2020. – V. 723. – P. 137920.

### *В материалах конференций и иных изданиях:*

6. Канева (Рыбак), А.В. Методы оценки состояния окружающей среды с использованием дождевых червей / А.В. Канева (Рыбак), Е.С. Белых, И.О. Велегжанинов, Т.А. Майстренко // Материалы X Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Биодиагностика состояния природных и природно-техногенных систем». – Киров, 2012. – С. 142–145.
7. Канева (Рыбак), А.В. Применение метода ДНК-комет для оценки чувствительности клеток дождевых червей (*Lumbricus rubellus*) к действию тяжёлых естественных радионуклидов / А.В. Канева (Рыбак), И.О. Велегжанинов, Е.С. Белых // Материалы докладов II Всероссийской (XVII) молодёжной научной конференции (с элементами научной школы) «Молодёжь и наука на Севере». – Сыктывкар, 2013. – С. 50–51.
8. Канева (Рыбак), А.В. Оценка экологического состояния почвы на основе биологических показателей почвенных беспозвоночных (на примере *Allolobophora* sp.) / А.В. Канева (Рыбак), Т.А. Майстренко, И.О. Велегжанинов, Е.С. Белых // Сборник научных трудов III Информационной школы молодого учёного. – Екатеринбург, 2013. – С. 443–447.
9. Канева (Рыбак), А.В. Оценка последствий радиоактивного загрязнения почвы для биоты на основе анализа параметров стабильности генома особей *Lumbricus rubellus* / А.В. Канева (Рыбак), Е.С. Белых, И.О. Велегжанинов, Т.А. Майстренко // Материалы IV Международной конференции «Радиоактивность и радиоактивные элементы в среде обитания человека». – Томск, 2013. – С. 254–256.
10. Канева (Рыбак), А.В. Оценка стабильности генома дождевых червей, обитающих на территории с повышенным содержанием радионуклидов и тяжёлых металлов в почве / А.В. Канева (Рыбак), И.О. Велегжанинов // Материалы докладов XXI Всероссийской молодёжной научной конференции «Актуальные проблемы биологии и экологии», посвященной 70-летию А.И. Таскаева. – Сыктывкар, 2014. – С. 289–294.
11. Велегжанинов, И.О. Генотоксические эффекты у дождевых червей с техногенно-

загрязнённой территории / И.О. Велегжанинов, **А.В. Канева (Рыбак)**, Е.С. Белых, Т.А. Майстренко, Д.М. Шадрин, Я.И. Пылина // Материалы XVII Всероссийского совещания по почвенной зоологии «Проблемы почвенной зоологии», посвященного 75-летию со дня рождения член-корреспондента РАН Д.А. Криволицкого. – Москва, 2014. – С. 53–54.

12. **Канева (Рыбак), А.В.** Оценка уровня повреждений ДНК дождевых червей из популяций, обитающих в почве техногенно загрязнённой территории / **А.В. Канева (Рыбак)**, Т.А. Майстренко, Е.С. Белых, И.О. Велегжанинов, Я.И. Пылина, Д.М. Шадрин // Материалы XII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Биодиагностика состояния природных и природно-техногенных систем». – Киров, 2014. – С. 235–238.

13. Белых, Е.С. Видовое разнообразие растительных сообществ на антропогенно загрязнённых тяжёлыми естественными радионуклидами территориях / Е.С. Белых, Т.А. Майстренко, **А.В. Канева (Рыбак)**, Б.И. Груздев, О.М. Вахрушева, А.В. Трапезников, В.Г. Зайнуллин // Материалы Международной конференции «Биологические эффекты малых доз ионизирующей радиации и радиоактивное загрязнение среды». – Сыктывкар, 2014. – С. 203–207.

14. **Канева (Рыбак), А.В.** Внутри- и межгрупповые генетические различия у дождевых червей, обитающих в почвах с разным уровнем техногенного загрязнения / **А.В. Канева (Рыбак)**, Д.М. Шадрин, Я.И. Пылина, И.О. Велегжанинов // Материалы докладов XXII Всероссийской молодежной научной конференции «Актуальные проблемы биологии и экологии». – Сыктывкар, 2015. – С. 226–231.

15. **Рыбак, А.В.** Влияние дополнительного воздействия кадмия и облучения на дождевых червей техногенно загрязнённой территории / **А.В. Рыбак**, Т.А. Майстренко, И.О. Велегжанинов // Материалы XIV Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Биодиагностика состояния природных и природно-техногенных систем». – Киров, 2016. – С. 210–213.

16. Майстренко, Т.А., Видовое разнообразие сообществ сосудистых растений в условиях хронического радиационного воздействия / Т.А. Майстренко, Е.С. Белых, **А.В. Рыбак** // Материалы XIV Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Биодиагностика состояния природных и природно-техногенных систем». – Киров, 2016. – С. 151–155.

17. **Рыбак, А.В.** Влияние кадмия на дождевых червей, населяющих фоновые и техногенно загрязнённые участки / **А.В. Рыбак**, Т.А. Майстренко, И.О. Велегжанинов, Е.С. Белых // Вестник Воронежского государственного университета. Серия: Химия. Биология. Фармация. – 2018. – № 2. – С. 235–245.

18. **Рыбак, А.В.** Изучение генетического полиморфизма популяций животных и растений в условиях локального техногенного загрязнения / **А.В. Рыбак**, Е.С. Белых, Т.А. Майстренко, Д.М. Шадрин, Я.И. Пылина, И.Ф. Чадин, И.О. Велегжанинов // Молодежь и наука на Севере. Материалы докладов III Всероссийской (XVIII) молодёжной научной конференции (с элементами научной школы) «Молодёжь и наука на Севере». – Сыктывкар, 2018. – С. 73–75.

19. **Рыбак, А.В.** Микроэволюционные изменения в природных популяциях *Trifolium pratense* и *Aporrectodea caliginosa* при техногенном загрязнении почв / **А.В. Рыбак**, Е.С. Белых, Т.А. Майстренко, И.О. Велегжанинов, Я.И. Пылина, Д.М. Шадрин, И.Ф. Чадин // Экология и эволюция: новые горизонты: Материалы Международного симпозиума, посвящённого 100-летию академика С. С. Шварца. – Екатеринбург, 2019. – С. 330–334.