



## UJI LENGOS CACING TANAH UNTUK MENDETEKSI IMIDAKLOPRID PADA EKOSISTEM TERESTRIAL

Earthworm Avoidance Test to Detect the Presence of Imidacloprid in Terrestrial Ecosystem

SULASTRI, TARUNI SRI PRAWASTI and TRI HERU WIDARTO

### ABSTRACT

Avoidance behaviour of two earthworm species (*Eisenia foetida* and *Pheretima asiatica*) has been used in our study to detect the presence of imidacloprid in their habitat. This study was conducted by observing their behaviour in a glass box divided into two chambers with a separator in the middle. One chamber was filled with the control soil and the other was filled with the treatment soil. After the separator was taken out, ten adult earthworms were placed between the two chambers. After 12, 24, 48 and 72 hours of exposure, we counted the earthworms in each chamber. One control, three sublethal concentrations, and a lethal concentration were applied for this experiment. They were 0, 0.5, 1, 1.5 and 2 ppm for *E. foetida* and 0, 2.2, 4.3, 6.5 and 8.63 ppm for *P. asiatica*. Each treatment were with five replicates. The results show that avoidance response was displayed only by *E. foetida*. This species did not like the presence of imidacloprid in its sublethal concentrations by avoiding it and moving to the control media. This response could be observed within 24-48 hours. This response could not be observed in *P. asiatica*. In addition, this species was less sensitive to imidacloprid than *E. foetida*. We, therefore, suggest that *E. foetida* was better than *P. asiatica* in detecting imidacloprid in the soil using avoidance test.

Kata kunci : cacing tanah, uji lengos, perilaku, imidakloprid, subletal

Perilaku menghindari polutan dua jenis cacing tanah yaitu *Eisenia foetida* dan *Pheretima asiatica* akan digunakan untuk mengevaluasi potensi uji lengos dengan imidakloprid sebagai polutan modelnya. Percobaan ini dilakukan dengan mengamati perilaku mereka di dalam kotak kaca yang dibagi menjadi dua kamar yang disekat dengan kaca pemisah. Satu kamar diisi dengan media kontrol dan kamar lainnya diisi dengan media perlakuan. Lalu kaca pemisah diangkat dan 10 cacing dewasa diletakkan diantara dua kamar tersebut. Setelah 12, 24, 48 dan 72 jam pemaparan, cacing di setiap kamar dihitung jumlahnya. Konsentrasi yang digunakan adalah satu kontrol, tiga konsentrasi subletal, dan konsentrasi letal, yaitu 0, 0.5, 1, 1.5 dan 2 ppm untuk *E. foetida* dan 0, 2.2, 4.3, 6.5, dan 8.63 ppm untuk *P. asiatica*. Setiap perlakuan terdiri dari lima ulangan. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa respon menghindari imidakloprid hanya tampak pada *E. foetida*. Spesies ini tidak menyukai kehadiran imidakloprid pada konsentrasi subletalnya dengan cara menghindari imidakloprid dan pergi ke kontrol. Respon ini sudah terlihat dalam 24-48 jam. Respon menghindar ini tidak tampak jelas pada *P. asiatica*. Selain itu, spesies ini juga kurang sensitif terhadap imidakloprid dibandingkan *E. foetida*. Oleh karena itu, kami berkesimpulan bahwa *E. foetida* adalah lebih baik dari *P. asiatica* dalam mendeteksi imidiakloprid dengan menggunakan uji lengos.

Keywords : earthworm, avoidance test, behaviour, imidacloprid, sublethal



## PENDAHULUAN

Metode yang komprehensif diperlukan untuk mendeteksi dan memonitor efek polutan terhadap lingkungan (Copewiez 2003). Sampai saat ini, metode baku yang digunakan adalah uji toksitas akut, yaitu menentukan konsentrasi yang menyebabkan kematian organisme sebesar 50% (LD50). Namun LD50 saja tidak cukup memadai untuk uji toksitas suatu bahan kimia atau polutan, karena LD50 tidak dapat memperlihatkan efek subletalnya. Karena itu digunakan pula uji toksitas subakut. Dengan uji ini efek subletal suatu polutan terhadap organisme non target dapat dikaji. Sayangnya kedua jenis uji toksitas tersebut membutuhkan waktu yang lama (7-21 hari dengan menggunakan cacing tanah) untuk mendapatkan hasilnya (ASTM 1997). Selain itu, jumlah polutan yang mencemari lingkungan terus bertambah dari waktu ke waktu. Karena itu, beberapa peneliti mengkaji uji lengos sebagai suatu metode alternatif atau uji tambahan agar didapat gambaran yang lebih menyeluruh tentang kondisi suatu lingkungan dengan lebih cepat (Schaefer 2003).

Uji lengos (*avoidance test*) adalah suatu metode pengujian yang memanfaatkan perilaku hewan uji dalam merespon perubahan kondisi fisik dan kimia lingkungan hidupnya. Respon perilaku yang ditunjukkan hewan dapat memiliki implikasi ekologis (Hartwell *et al.* 1989; Wentsel & Guelta 1987). Misalnya, cacing tanah yang bermigrasi meninggalkan habitatnya dapat menurunkan kualitas tanah yang ditinggalkannya. Respon perilaku ini dapat terlihat pada konsentrasi polutan dibawah konsentrasi subletal. Karena itu dengan uji lengos sensitifitas pengujian dapat ditingkatkan (Greene *et al.* 1989). Uji lengos juga relatif lebih cepat menunjukkan hasil dan lebih mudah dilakukan (Yeardley *et al.* 1996).

Sebagian besar pencemaran lingkungan diakibatkan oleh kegiatan manusia. Pencemaran ini menimbulkan berbagai dampak ekologis yang merugikan bagi lingkungan terestrial maupun akuatik. Salah satunya adalah pemakaian pestisida dalam bidang pertanian. Pada lingkungan terestrial pestisida ini dapat mengganggu beberapa organisme tanah bahkan membunuhnya. Dalam hal ini cacing tanah adalah salah satu organisme tanah yang sering dirugikan.

Cacing memiliki kemampuan untuk mendeteksi dan merespon senyawa kimiawi yang ada di lingkungan hidupnya (Slimak 1997; Mather & Christensen 1998). Kemampuan ini didukung oleh banyaknya kemoreseptor yang terkonsentrasi di daerah prostomium dan segerigen anterior serta yang tersebar di seluruh permukaan tubuhnya (Wallwork 1983). Disamping itu cacing juga dapat menghindar



(melengos) dari lingkungan yang merugikannya karena didukung oleh kemampuan lokomotivinya (Stephenson *et al.* 1998).

Pestisida yang berbahan aktif imidakloprid adalah sejenis insektisida yang banyak digunakan oleh petani dan sangat merugikan bagi cacing tanah. Imidakloprid merupakan insektisida yang berspektrum luas. Imidakloprid didaftarkan sebagai pestisida di U.S.A pada tahun 1994. Insektisida ini telah digunakan di 120 negara untuk melindungi 140 jenis tanaman (Cox 2001). Karena itu imidakloprid digunakan sebagai pestisida model pada penelitian ini. Imidakloprid tergolong dalam kelompok nikotinoid. Imidakloprid merupakan insektisida sistemik yang menyerang sistem saraf dengan cara menghambat pelekatan asetilkolin pada reseptor sel saraf (Cox 2001), sehingga serangga menjadi lumpuh dan akhirnya mati. Pada konsentrasi subletal (0.2 ppm), imidakloprid dapat menurunkan aktivitas enzim selulase di lambung cacing (Cox 2001) dan meningkatkan perubahan bentuk sperma cacing (Luo 1999).

Penelitian ini bertujuan mengkaji penggunaan metode uji lengos dalam mendeteksi kehadiran senyawa kimia (polutan) di lingkungan terestrial dengan menggunakan *Eisenia foetida* dan *Pheretima asiatica* sebagai hewan uji. Secara khusus penelitian ini bertujuan melihat pengaruh konsentrasi imidacloprid dan lama waktu pemaparan serta interaksinya terhadap perilaku menghindar kedua spesies cacing tersebut.

## BAHAN DAN METODE

### Pemeliharaan cacing

*Eisenia foetida* dan *Pheretima asiatica* berasal dari Tajur, Bogor. Cacing tersebut diberi pakan secara *ad libitum* dengan kotoran sapi yang disterilisasi pada suhu 80°C di dalam oven selama dua jam. Pemanasan ini bertujuan mematikan kokon dan cacing lain yang tidak diinginkan. Cacing yang digunakan dalam penelitian ini adalah cacing dewasa.

Cacing dibersihkan dengan air kemudian ditimbang. Cacing yang memiliki bobot tubuh relatif sama dipisahkan. Bobot tubuh untuk *E. foetida* yang digunakan berkisar 280-310 mg sedangkan *P. asiatica* berkisar 180-210 mg. Setelah itu cacing tersebut diadaptasikan di dalam media uji lengos selama dua hari.



### Media dan prosedur percobaan

Media yang digunakan terdiri dari campuran satu sendok makan kotoran sapi dan 400 g tanah (bobot kering) yang telah disterilisasi pada suhu 80°C selama dua jam dan dihaluskan serta disaring ( $\leq 1.7$  mm). Selanjutnya air destilata atau larutan imidakloprid ditambahkan sebanyak 30% dari bobot kering tanah yaitu 120 ml. Karakteristik tanah yang digunakan adalah sebagai berikut: 21% pasir, 40% debu dan 39% liat, 1.06% bahan organik, 16.10 cmol/Kg kapasitas tukar ion, dan pH (H<sub>2</sub>O) sebesar 6.6.

Alat yang digunakan adalah kotak kaca berukuran 20 x 20 x 10 cm. Kotak ini dibagi menjadi dua kamar (*chamber*) dengan pemisah kaca (Hund-rinke & Wiechering 2001). Kamar sebelah kiri diisi media kontrol dan kamar sebelah kanan diisi media perlakuan. Setelah itu, pemisah kaca diangkat, dan diletakkan 10 ekor cacing dewasa diantara kedua kamar tersebut. Selanjutnya kotak kaca ditutup dengan plastik hitam yang telah dilubangi. Berdasarkan LD<sub>50</sub>72 jam, tiga konsentrasi subletal, satu konsentrasi letal, dan kontrol digunakan untuk melihat pengaruhnya terhadap respon cacing. Konsentrasi letal *E. foetida* sebesar 2.21 ppm dan *P. asiatica* sebesar 8.63 ppm (Feriza 2005, komunikasi pribadi). Konsentrasi subletal yang digunakan adalah 0.5, 1, 1.5 ppm untuk *E. foetida* dan 2.2, 4.3, 6.5 ppm untuk *P. asiatica*.

Perhitungan jumlah cacing di tiap kamar dilakukan pada saat pengamatan setelah pemaparan selama 12, 24, 48, dan 72 jam pada kotak yang sama, perlakuan ini disebut perlakuan dengan pembongkaran. Pengamatan juga dilakukan pada pemaparan selama 24 dan 48 jam di kotak yang terpisah dengan satu konsentrasi subletal, perlakuan ini disebut perlakuan tanpa pembongkaran. Setiap perlakuan dilakukan lima kali langkah.

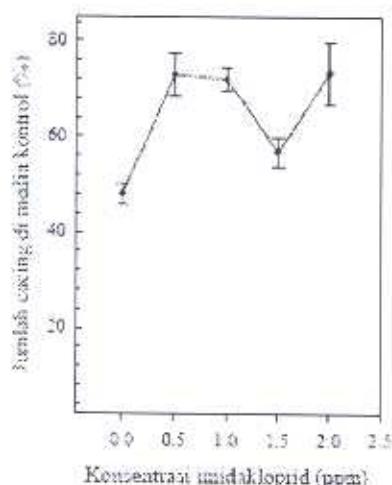
Data yang diperoleh diolah dengan metode statistik *two-way* ANOVA (konsentrasi dan lama waktu pemaparan) di dalam program *Systat 10*.

## HASIL

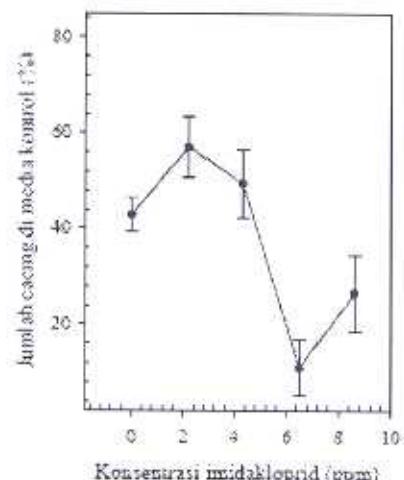
### Pengaruh konsentrasi dan lama waktu pemaparan serta interaksinya

Konsentrasi imidakloprid berpengaruh sangat nyata ( $p < 0.01$ ) terhadap jumlah cacing tanah yang berpindah ke media kontrol (Gambar 1 dan 2). Pada 0 ppm, cacing menyebar secara acak, yaitu 48% dan 52% pada kedua media. Untuk perlakuan 0.5, 1, dan 2 ppm, lebih dari 70% *E. foetida* berada pada media kontrol (Gambar 1). Sedangkan untuk perlakuan 1.5 ppm, 56% cacing berada di media kontrol. Pada *P. asiatica* untuk konsentrasi 2.2 dan 4.3 ppm, jumlah cacing yang berada di media kontrol tidak

berbeda dengan 0 ppm (Gambar 2). Sedangkan pada dua konsentrasi tertinggi, jumlah cacing yang berada di media kontrol jauh berada di bawah 50 %.

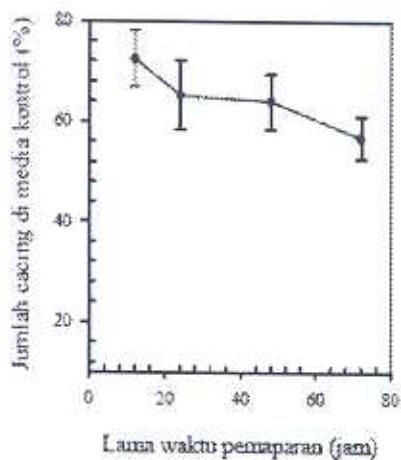


Gambar 1 Respon *Eisenia foetida* terhadap kehadiran imidakloprid di perlakuan dengan pembongkaran.

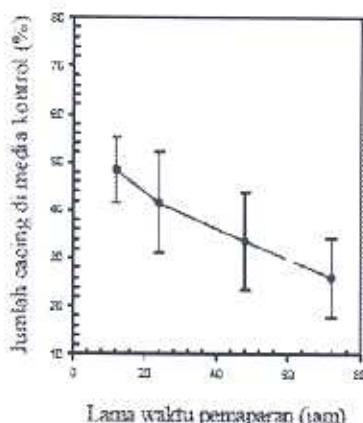


Gambar 2 Respon *Pheretima asiatica* terhadap kehadiran imidakloprid di perlakuan dengan pembongkaran.

Lamanya waktu pemaparan imidakloprid juga berpengaruh terhadap jumlah cacing yang berada di media kontrol (Gambar 3 dan 4). Semakin lama terpapar, jumlah cacing yang berada di media kontrol semakin berkurang. Pada 12 jam pemaparan, 72.4% *E. foetida* berada di media kontrol. Jumlahnya terus berkurang hingga 56.8% di 72 jam pemaparan. Sedangkan pada *P. asiatica*, hanya 48.4% cacing berada di media kontrol di 12 jam pemaparan, dan terus berkurang hingga 26% di 72 jam pemaparan. Hasil ini khususnya dicatat dari perlakuan dengan pembongkaran.



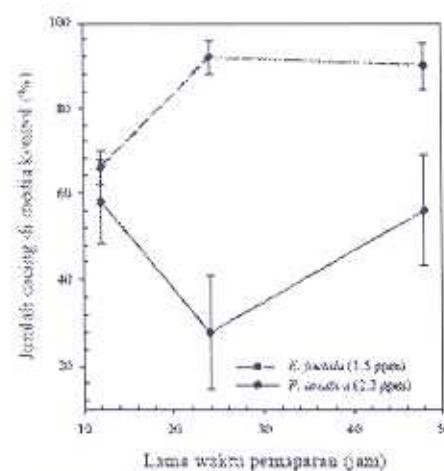
Gambar 3 Respon *Eisenia foetida* terhadap lama waktu pemaparan imidakloprid di perlakuan dengan pembongkaran.



Gambar 4 Respon *Pheretima asiatica* terhadap lama waktu pemaparan imidakloprid di perlakuan dengan pembongkaran.

Pengamatan pada perlakuan tanpa pembongkaran menunjukkan hasil yang berbeda, khususnya pada *E. foetida* yang terpapar imidakloprid dengan konsentrasi 1.5 ppm. Pada *E. foetida* sebanyak 66%, 92%, dan 90% cacing berada di media kontrol setelah terpapar berturut-turut selama 12, 24, dan 48 jam. Sementara itu pada *P. asiatica*, 58%, 28%, dan 56% cacing yang berada di media kontrol setelah terpapar berturut-turut selama 12, 24 dan 48 jam (Gambar 5). Jumlah cacing di 12 jam pemaparan pada perlakuan ini diperoleh dari hasil perlakuan dengan pembongkaran.

Interaksi antara konsentrasi dan lama waktu pemaparan tidak mempengaruhi jumlah cacing di media kontrol ( $p = 0.817$  untuk *E. foetida* dan  $p = 0.658$  untuk *P. asiatica*).



Gambar 5 Respon cacing terhadap kehadiran imidakloprid di perlakuan tanpa pembongkaran.

### Perpindahan dan kematian cacing

Jumlah cacing yang berpindah dari media kontrol menuju ke media berimidakloprid lebih banyak daripada sebaliknya. Jumlah cacing yang berpindah ke imidakloprid semakin banyak dengan bertambahnya waktu pemaparan (Gambar 3 dan 4).

*E. foetida* sudah ada yang mati sebesar 12.2% di konsentrasi 1.5 ppm dan 12.05% di konsentrasi 2 ppm setelah 72 jam pemaparan. Sedangkan *P. asiatica* yang mati baru mulai

ditemukan di konsentrasi 4.3 ppm sebesar 6% setelah 48 jam pemaparan dan 16% setelah 72 jam pemaparan. *P. asiatica* yang mati sebesar 10%, 6%, 52% di konsentrasi 6.5 ppm, dan 8%, 36%, dan 32% di konsentrasi 8.6 ppm setelah terpapar berturut-turut selama 24, 48, 72 jam.

## PEMBAHASAN

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa konsentrasi dan lama waktu pemaparan sangat berpengaruh pada respon cacing (perilaku menghindar). Respon kedua jenis cacing terhadap lama waktu pemaparan adalah sama, sedangkan respon mereka terhadap konsentrasi sangat berbeda. *E. foetida* sudah dapat merespon kehadiran imidakloprid di media perlakuan dalam waktu 12 jam. Lebih dari 70% cacing menghindar dari media tersebut dan memilih tinggal di media kontrol. Namun respon ini tidak tampak di konsentrasi 1.5 ppm, sedangkan di konsentrasi 2 ppm respon ini kembali terlihat. Hal ini sulit untuk dijelaskan. Oleh karena itu dilakukan percobaan tambahan untuk konsentrasi 1.5 ppm. Tujuan dari percobaan ini adalah ingin melihat berapa besar pengaruh pembongkaran terhadap respon

cacing. Untuk menghindari pembongkaran, maka pengamatan dilakukan pada kotak yang terpisah. Pengamatan tersebut menunjukkan bahwa lebih dari 90% cacing berada di media kontrol setelah dipapar dengan imidakloprid selama 24 dan 48 jam. Nilai ini sangat berbeda jika dibandingkan dengan respon cacing pada perlakuan dengan pembongkaran (56%).

Pembongkaran menyebabkan cacing kehilangan orientasinya. Lubang-lubang galian yang dibuat menjadi rusak sehingga cacing tidak dapat berbalik arah. Padahal penggunaan kembali lubang galian oleh *E. foetida* cukup tinggi sebesar 40-70% (Feriza 2005, komunikasi pribadi). Disamping itu pembongkaran juga menyebabkan cacing terganggu, sehingga cacing bergerak secara acak untuk meninggalkan tempat tinggalnya, dan harus beradaptasi kembali dari awal.

Jumlah cacing yang meninggalkan media kontrol lebih banyak daripada jumlah cacing yang meninggalkan media imidakloprid (Gambar 3 dan 4). Perpindahan ini disebabkan cacing yang berada di media kontrol masih sehat, sehingga kemampuan lokomosinya lebih baik daripada cacing yang berada di media imidakloprid. Cacing yang berada di media imidakloprid menjadi sangat lemah, mungkin karena sebagian besar energinya sudah teralokasi untuk menetralisir racun yang masuk ke tubuh mereka (Gibbs *et al.* 1996). Cacing ini tetap berada di media berimidakloprid dan akhirnya mati di akhir percobaan.

Dari hasil pengamatan dengan perlakuan tanpa pembongkaran terlihat pula bahwa uji lengos sudah dapat memberikan hasil setelah 24 jam pemaparan. Respon menghindar cacing sudah dapat terlihat dan nilainya tidak banyak berubah setelah 48 jam. Jadi uji ini lebih menghemat waktu dibandingkan uji akut dan subakut. Lamanya waktu yang dibutuhkan oleh uji ini sesuai dengan yang dilaporkan oleh Yeardley *et al.* (1996), bahwa uji lengos hanya membutuhkan waktu sekitar satu atau dua hari.

Namun demikian, hasil seperti di atas tidak terlihat ketika menggunakan *P. Asiatica* sebagai hewan uji. *P. asiatica* tidak menunjukkan respon menghindar dari imidakloprid. Respon yang muncul di 2.2 dan 4.3 ppm tidak berbeda dengan respon yang ditunjukkan di konsentrasi 0 ppm. Cacing bergerak secara acak baik di perlakuan dengan pembongkaran maupun tanpa pembongkaran. Hal ini disebabkan oleh pergerakan mereka yang sangat aktif dan sensitifitasnya yang rendah dibandingkan *E. foetida*. Rendahnya sensitifitas *P. asiatica* dapat dilihat dari nilai LD50. LD50 *P. asiatica* lebih tinggi dibandingkan *E. foetida*. Semakin tinggi nilai LD50nya maka cacing tersebut semakin kurang sensitif.

*P. asiatica* di konsentrasi 2.2 ppm masih bisa berpindah-pindah karena pada konsentrasi ini mereka tidak terpengaruh, seperti yang ditunjukkan oleh hasil perlakuan tanpa pembongkaran. Sementara itu di dua konsentrasi tertinggi, mereka memberikan respon yang sangat rendah. Hal ini dikarenakan setelah 12 jam pemaparan sebagian besar cacing yang berada di media imidakloprid sudah teracuni dan menjadi lemah. Mereka menjadi sulit bergerak dan menghindar dari imidakloprid dan akhirnya mati. Disamping itu pembongkaran juga menyebabkan cacing yang berada di media kontrol terganggu, membuat cacing berlokomosi secara acak untuk pindah. Akibatnya semakin lama waktu pemaparan, jumlah cacing di media control semakin menurun.

Penelitian ini menunjukkan bahwa respon menghindar hanya tampak pada *E. foetida* saja. Yeardley *et al.* (1996) juga menggunakan hewan uji yang sama dengan polutan yang berbeda yaitu, tiga polutan (KCl, NH4Cl, dan 2-chloroacetamide) dan dua jenis tanah dari kawasan pertambangan yang sudah tercemar oleh logam (mangan, zink, besi, dan tembaga). Pada semua perlakuan tersebut, *E. foetida* menunjukkan respon menghindar yang nyata kecuali pada 2-chloroacetamide yang hingga saat ini belum diketahui alasannya. Senyawa ini memiliki efek narkotik tetapi bukan termasuk komponen narkotik. Respon menghindar pada penelitian ini sudah dapat terdeteksi setelah satu hingga dua hari.

Pada tahun 1998, metode uji lengos ini dimodifikasi oleh Stephenson *et al.* Dengan menggunakan enam kamar dan jenis cacing yang sama. Polutan yang digunakan adalah tanah yang mengandung campuran minyak bumi yang dihasilkan dari proses pemisahan gas alam. Hasil dari penelitian ini menunjukkan bahwa *E. foetida* sudah dapat menghindar dari tanah tersebut setelah 24 jam. Kemudian Schaefer (2003) membandingkan metode dua kamar dan enam kamar dengan jenis cacing yang sama tetapi polutannya berbeda, yaitu tanah yang dicemari oleh 2,4,6-trinitrotoluena (TNT) dan minyak mentah. Kedua metode tersebut memberi hasil yang sama, yaitu 90% atau lebih *E. foetida* menghindar dari tanah tersebut dalam waktu 48 jam.

Penelitian ini menunjukkan bahwa *P. asiatica* memperlihatkan respon yang tidak konsisten dan sulit diprediksi. Meskipun demikian uji lengos masih berpotensi untuk dijadikan metode pendekripsi polutan di lingkungan terestrial. Dalam hal ini, kami berpendapat bahwa *E. foetida* lebih tepat dijadikan hewan uji pada uji lengos karena *E. foetida* lebih sensitif dibandingkan *P. asiatica*.

## DAFTAR PUSTAKA

- [ASTM] American Society for Testing and Material. 1997. Standard guide for conducting a laboratory soil toxicity test with lumbricid earthworm *Eisenia foetida*. Revisi dari E1676-95 ASTM Standard. Philadelphia: ASTM
- Capowiez Y, Rault M, Mazzia C, Belzunces L. 2003. Earthworm behaviour as a biomarker – a case study using imidacloprid. *Pedobiologia* 47 (56): 542-547.
- Cox C. 2001. Insecticide factsheet / imidacloprid. *J Pestic Ref* 21 (1): 15-21.
- Gibbs MH, Wickler LF, Stewart AJ. 1996. A method for assessing sublethal effects of contaminants in soils to earthworms, *Eisenia foetida*. *Environ Toxicol Chem* 15: 360-368.
- Greene JC *et al.* 1989. Protocols for short term toxicity screening of hazardous waste sites. EPA/600/3-88/09. U.S. Environmental Protection Agency, Corvalis, OR.
- Hartwell SI, Jin JH, Cherry DS, Caims Jr. 1989. Toxicity versus avoidance responses of golden shiner, *Notemigonus crysoleucas*, to five metals. *J Fish Biol* 35: 447-243.
- Hund-Rinke K, Wiechering H. 2001. Earthworm avoidance test for soil assessment. *J soils & Sediments* 1: 15-20.
- Luo Y. 1999. Toxicology study of two novel pesticides on earthworm, *Eisenia foetida*. *Chemosphere* 39: 2347-2356.
- Mather JG, Christensen OM. 1998. Earthworm surface migration in the field: influence of pesticides using benomyl as test chemical. Di dalam: Sheppard CS *et al.*, (editor.) *Advances in earthworm ecotoxicology*. Pensacola: SETAC Pr. hlm 327-340.
- Schaefer M. 2003. Behavioural endpoints in earthworm ecotoxicology: evaluation of different test system in soil toxicity assessment. *J Soils & sediments* 3 (2): 79-84.
- Slimak KM. 1997. Avoidance response as a sublethal effect of pesticides on *Lumbricus terrestris* (Oligochaeta). *Soil Biol Biochem* 29: 713-715.
- Stephenson G *et al.* 1998. Use of an avoidance-respon test to assess the toxicity of contaminated soils to earthworms. Di dalam: Sheppard CS *et al.*, (editor). *Advances in Earthworm Ecotoxicology*. Pensacola: SETAC Pr. hlm 67-81.
- Wallwork JA. 1983. *Earthworm Biology. Studies in Biology* No. 161. Southampton: Camelot Pr.
- Wentsel SW, Guelta MA. 1988. Avoidance of brass powder-contaminated soil by earth worm, *Lumbricus terrestris*. *Environ Toxicol Chem* 7: 241-243.
- Yeardley RB, Lazorchak JM, Gast LC. 1996. The potential of an earthworm avoidance test for evaluation of hazardous waste sites. *Environ Ecotoxicol Chem* 15 (9): 1532- 1537.