

## Модификация биотеста с энхитреидами для оценки характера загрязнения субстрата осадками сточных вод

© 2020. А. П. Баранов<sup>1</sup>, с. н. с.,

**М. И. Лунёв<sup>1</sup>**, д. б. н., зав. лабораторией,

**Л. П. Воронина<sup>2</sup>**, д. б. н., в. н. с.,

<sup>1</sup>ВНИИ агрохимии им. Д. Н. Прянишникова,

127434, Россия, г. Москва, ул. Прянишникова, д. 31а,

<sup>2</sup>Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова,

119991, Россия, г. Москва, Воробьевы горы, д. 1, стр. 12,

e-mail: Luydmila.voronina@gmail.com

Интерпретация результатов биотестирования проводится на основании их сопоставления с данными химического анализа исследуемого объекта. Достаточно часто данные химического анализа плохо коррелируют с показателями биотестирования, зависящими как от биодоступности поллютантов, так и от совокупного действия комплекса веществ в образце. Кроме того, в случае загрязнения поллютантом неизвестного характера или сложного многокомпонентного загрязнения трудно выбрать необходимые химические анализы и получить полную картину химического загрязнения. Рассмотрен методический приём биотестирования с использованием антидотов для определения характера химического загрязнения субстрата. Биотестирование (с тест-культурой *Enchytraeus albidus*) выполнено в лабораторных экспериментах с растворами и водными экстрактами из компоста осадков сточных вод. Исследована возможность использования антидота-1 реактиватора ацетилхолинэстеразы (1-метилникотинамида иодида) для определения присутствия метафоса и антидота-2 (димеркаптопропансульфоната натрия) для определения присутствия Cd. Для адаптации тест-культур (*Enchytraeus albidus*), используемых в экологических исследованиях по определению токсичности в образцах методом биотестирования, проведена их предварительная обработка специфическими антидотами. Установлено, что использование адаптированных тест-организмов (*E. albidus*) для оценки токсичности объекта, имеющего в своём составе вещество, отзывчивое на данный антидот, сопровождается снижением показателя токсичности. Результаты подтверждают целесообразность использования в биотестировании представленного в работе методического подхода. Таким образом, использование антидотов в методах биотестирования может приблизить нас к пониманию этиологии токсичности исследуемого объекта. Развитие данного направления нуждается в тщательной проработке не только в связи с модификацией метода биотестирования, но и для выполнения процедуры рекультивации загрязнённых объектов.

**Ключевые слова:** биотестирование, энхитреиды (*Enchytraeidae*), антидот, поллютант.

## Modification of a bioassay with enchytraeids for ecotoxicological assessment of contaminated soil

© 2020. A. P. Baranov<sup>1</sup> ORCID: 0000-0001-8857-6693<sup>†</sup>

**M. I. Lunev<sup>1</sup>** ORCID: 0000-0001-5751-5281<sup>†</sup>

**L. P. Voronina<sup>2</sup>** ORCID: 0000-0003-1917-7490<sup>†</sup>

<sup>1</sup>ARSRI for Institute of Agrochemistry named after D. N. Pryanishnikova,

31a, Pryanishnikova St., Moscow, Russia, 127434,

<sup>2</sup>Lomonosov Moscow State University,

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

e-mail: Luydmila.voronina@gmail.com

Interpretation of bioassay results of both mono-contamination and complex multifactorial ones is carried out on the basis of comparison with the data of chemical analysis. Quite often, chemical analysis data correlate poorly with bioassay indicators of toxicity, which depend on both the bioavailability of pollutants, and the entire set of conditions of the contaminated area. In addition, in case of contamination with a pollutant of unknown properties or complex, multi-component contamination, it is difficult to select the necessary chemical analyses and obtain a complete picture of chemical contamination. However, the nature and source of the toxic effect may remain unexplained. Bioassay (test culture of *Enchytraeus albidus*) was carried out in the laboratory experiments with solutions and water extracts from the compost

of sewage sludge. Lab experiments studied the possibility for the use of the antidote-1 (1-methylnicotinamide iodide) to determine the presence of metaphos, and antidote-2 (dimercaprol sodium) to determine the presence of Cd. Test organisms (*E. albidus*) used for ecological studies to determine the toxicity in test samples by bioassay undergo adaptation by preliminary treatment with specific antidotes. It was determined that use of adapted test organisms to evaluate the toxicity of sample that has substance sensitive to the particular antidote leads to the decrease of toxicity. Thus the use of antidotes for bioassay may close the gap to our understanding of etiology and causes of toxicity of the sample under study. Further development of the study requires meticulous approach not only because of the change to bioassay but due to requirements for recultivation procedures for contaminated samples as well.

**Keywords:** bioassay, Enchytraeidae, antidote, pollutant.

Биотестирование почвы, оценка её экотоксикологического состояния по стандартизированным реакциям живых организмов является наиболее адекватным методом прогноза «здоровья» почвы в условиях многофакторной антропогенной нагрузки [1]. Современные проблемы загрязнения почв, связанные с глобальным распространением загрязнителей, аккумуляцией тяжёлых металлов (ТМ), возрастающим применением осадков сточных вод (ОСВ), утилизацией промышленных отходов [2], требуют оценок и прогнозов изменения состояния почвы.

При биотестировании, например, ОСВ, имеющих сложный, непостоянный и неизвестный состав поллютантов, трудно установить, что является причиной проявления токсичности. Изучение влияния ОСВ и компостов ОСВ на объекты окружающей среды, обуславливает целесообразность использования методов биотестирования для определения интегральной характеристики токсичности. Однако определение причин токсичности остаётся актуальным. Учитывая влияние комплекса факторов среды на присутствующие в тест-объекте поллютанты, даже сопоставление результатов биотестирования с данными химического анализа не всегда позволяет определить вещество или ведущий класс загрязняющих веществ [3–5]. Это свидетельствует о необходимости усовершенствования методов биотестирования, чтобы приблизиться к решению задач по определению присутствия в образце возможных поллютантов.

С одной стороны, точные сведения по наличию в исследуемом образце конкретных токсических веществ позволяют прибегнуть к использованию специфических мелиорантов для восстановления загрязнённого объекта. С другой стороны, имея представление о специфических маркерах, устраняющих токсический эффект, можно их использовать для определения природы эффекта, установленного биотестированием. В случае наличия изменения уровня токсического эффекта под действием такого специфичного мелиоранта

(выступающего как антидот), можно говорить о конкретной химической природе данного эффекта, идентифицировать загрязнитель как представителя конкретного химического класса с определённым механизмом действия, т. е. установить природу токсичности.

Другим способом, который, на наш взгляд, может быть рассмотрен для определения загрязняющих веществ, способствующих повышению токсичности, является воздействие антидота на используемый в методе биотестирования живой организм (тест-культуру). Культура энхитреид (*Enchytraeidae*), мезопедобионтов, является чувствительной тест-культурой для оценки экотоксикологического состояния почвы [5, 6], для индикации химического стресса в агроэкосистемах и используется в биотестировании почв, загрязнённых поллютантами: ТМ [7, 8], полициклическими ароматическими углеводородами [9], нефтью [10], пестицидами [11]. Тест-культура обладает способностью поглощать и накапливать растворённые вещества из почвенного раствора через эпидермис [12]. Это свойство использовалось нами для подготовки тест-культуры с предварительной обработкой её водорастворимыми антидотами.

Целью нашей работы было повысить информативность биотестирования путём модификации метода, используя разные антидоты для определения химического характера загрязнения.

### Материалы и методы исследования

В лабораторных условиях выполнена серия биотестов с тест-культурой энхитреид (*Oligochaeta*, *Enchytraeidae*; вид – *Enchytraeus albidus*). Тест-объектом служили ОСВ Курьяновской станции очистных сооружений. С учётом высокого уровня содержания фосфора (который может быть представлен как органическими, так и неорганическими соединениями) [13] в ОСВ биотестирование проводилось с использованием антидота реактиватора ацетилхолинэстеразы 1-метилникотинамида иодида (Sigma-Aldrich), применяющегося

в качестве антидота фосфорсодержащих органических веществ (антидот-1) и димеркаптопропансульфоната натрия (Sigma-Aldrich) – антидота ряда ТМ (антидот-2) [14, 15].

Биотестирование модельных загрязнителей проводили на искусственной почве (70% – кварцевый песок, 20% – каолиновая глина, 10% – сфагновый торф, pH – 6,5 ед.), изготовленной в соответствии с межгосударственным стандартом ГОСТ 33637–2015. В образцы почвы вносили поллютанты с прогрессивной шкалой концентраций сильно действующего фосфорорганического инсектицида метафоса и нитрата кадмия  $Cd(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$  (производитель ЛенРеактив) в присутствии антидотов и без них, с последующим компостированием почвы в течение 3 недель. Нитрат кадмия вносили в виде водного 5% раствора в тонкий (1 см) слой почвы с последующим тщательным перемешиванием. Использовали диметилнитрофенилтиофосфат (паратрион метил, метафос), производитель – Индустриальный институт органической химии, г. Варшава, чистота 99,2. Данное вещество вносили в тонкий слой почвы в растворе гексана с экспозицией для выветривания и последующим тщательным перемешиванием. Для биотестирования модельных образцов использовали методику с тест-культурой энхитреид *Enchytraeus albidus*. Для биотестирования отбирали синхронизированные энхитреиды (одинакового размера с образовавшимся кольцом). Введение в опыт антидота проводили путём промывания части энхитреид в растворе соответствующего антидота в концентрации 0,1 мг/л, в течение 1 ч в чашках Петри при 20 °С. Образцы почвы с внесёнными дозами метафоса и нитрата кадмия экспонировали в стеклянных стаканчиках (50 мл) с перфорированными крышками в течение трёх недель.

Для проверки результатов лабораторного эксперимента был выполнен эксперимент с внесением компоста ОСВ в почву и последующим биотестированием образцов. Для опыта в соответствии со стандартом (ГОСТ Р 56226–2014) отбирали образцы компостированного в течение года ОСВ. Сосуды наполняли искусственной почвой массой 1 кг (контрольный вариант), опытными вариантами служили сосуды с добавлением ОСВ в пропорциях: 1, 2, 5, 25, 50 и 100% от общей массы. Поддерживали 60% полевую влагоёмкость.

В опытных образцах с ОСВ определяли pH, зольность образца (ГОСТ 26714-85), содержание подвижных форм фосфора (ГОСТ 26717-85), калия (ГОСТ 26718-85), общего

азота (ГОСТ 26715-85), органического углерода (ГОСТ 27980-88), ряда ТМ (медь, цинк, свинец, кадмий) [16], мышьяка [17].

Статистическую обработку результатов биотестирования проводили с помощью программы «MS Excel 2003» и прикладного пакета Statistica 6.0. Были определены общие статистические показатели: средние величины анализированных показателей ( $M$ ), стандартная ошибка среднего ( $m$ ) и наименьшая существенная разность ( $HCP$ ). Принятый в работе уровень значимости  $p = 0,05$ .

## Результаты и обсуждение

**Использование антидота 1-метилникотинамида иодида для биотестирования с энхитреидами при оценке токсичности метафоса.** На рисунке 1 показано изменение выживаемости энхитреид в зависимости от концентрации токсиканта по результатам двухнедельного теста. Повышение концентрации токсиканта статистически достоверно отражается на показателе выживаемости тест-организмов в интервале от 1 до 2 мг/л. Численность энхитреид в данном интервале снижается от  $35,0 \pm 6,8$  до  $25,0 \pm 1,6\%$ , соответственно с увеличением концентрации метафоса. В то же время, влияние антидота сказывается на всех уровнях содержания инсектицида. Токсическое действие всех испытуемых концентраций снижается после обработки (промывки) энхитреид антидотом с концентрацией равной 0,1 мг/л. Численность тест-культуры увеличивается и даже при использовании концентрации 2,0 мг/кг токсиканта остаётся на уровне  $75,0 \pm 4,9\%$ . В ряде публикаций обсуждается и доказана способность дождевых червей поглощать загрязняющие вещества через кожу [18–20]. Принадлежность малоцетинковых червей (*Oligochaeta*) к одному подклассу, близость анатомического строения (наличие целома) и кожных покровов позволяет предположить сходные функции у энхитреид с дождевыми червями. Механизм проницаемости покровов энхитреид, по-видимому, обуславливает и накопление хорошо растворимого в воде антидота, который проявляет в условиях биотестирования активность, связывая токсикант, снижая, таким образом, токсичность. С учётом используемого в работе интервала концентраций метафоса с 0,1 (ПДК метафоса в почве) до 2,0 мг/кг, данный приём улавливает низкие концентрации и может быть методически удобным и для определения

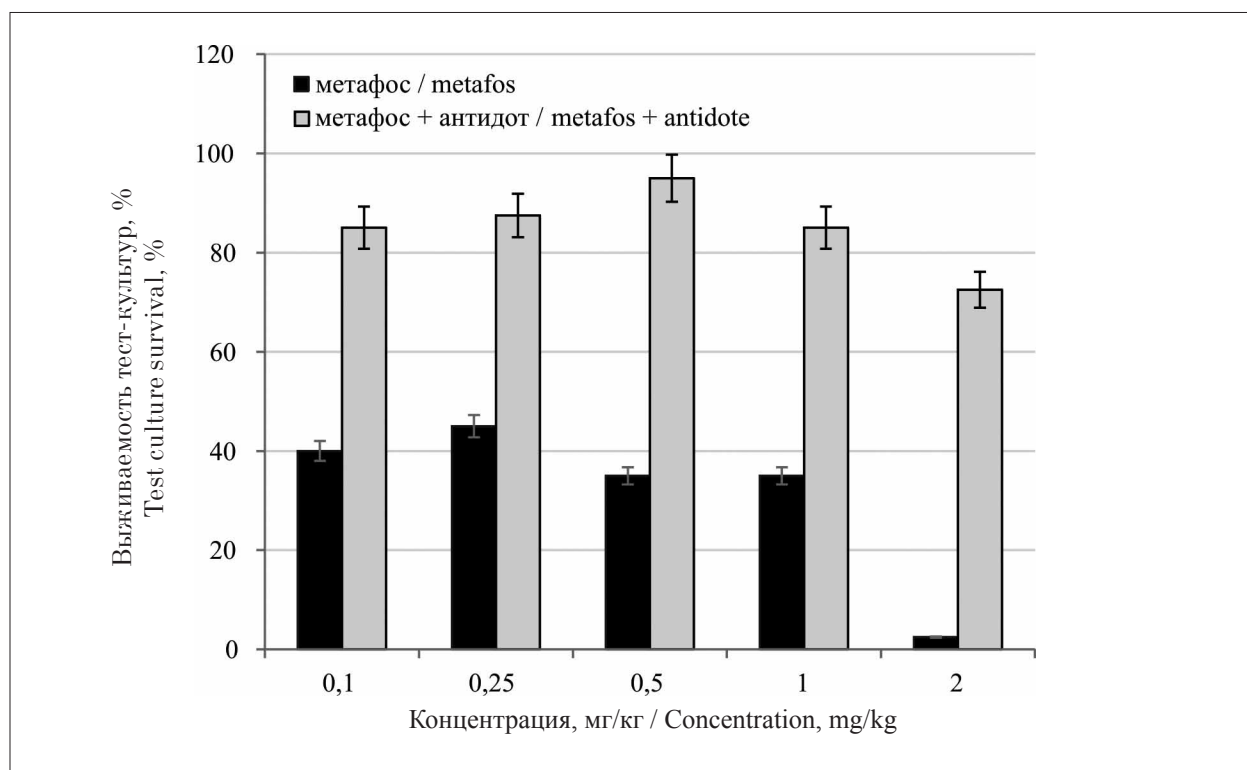


Рис. 1. Действие 1-метилникотинамид иодида (0,1 мг/л) и метафоса на выживаемость *Enchytraeus albidus*  
 Fig. 1. Effect of 1-methylnicotinamide iodide (0.1 mg/L) and metaphos on survivability of *Enchytraeus albidus*

загрязнения другими фосфорорганическими токсикантами.

**Использование антидота димеркаптопропансульфоната натрия для биотестирования с энхитреидами при оценке токсичности кадмия ( $Cd^{2+}$ ).** На рисунке 2 показано действие антидота на снижение токсичности кадмия по тест-показателю выживаемости тест-культуры энхитреид. Основным результатом данного опыта, также как и предыдущего, с никотинамидом, является пролонгированность защитного действия антидота, которое начинается с дозы Cd 20 мг/кг, проявляя достоверную активность. С этой же концентрации начинает проявляться и токсичность от внесения в почву кадмия. В соответствии с тестом выживаемость энхитреид при внесении Cd в концентрации 20 мг/кг до  $55 \pm 11\%$  и продолжает снижаться с увеличением концентрации. Однако с предварительным применением антидота численность организмов остаётся на уровне  $85 \pm 9\%$  и не изменяется при увеличении концентрации токсиканта в 2–3 раза. Антидот содержит сульфгидрильные группы, являющиеся биологической мишенью ТМ, что обеспечивает их детоксикацию. Таким образом, токсичность в биотестируемом

образце, обусловленная присутствием Cd, может быть идентифицирована с помощью тест-культуры энхитреид и антидота (димеркаптопропансульфоната натрия) в силу высокой его специфичности. Учитывая химическую основу токсичности ТМ, которая заключается в их способности связывать функциональные группы биологически важных веществ организма (прежде всего, сульфгидрильные группы ферментов) [21], этот метод можно рассматривать и для других ТМ.

**Использование антидотов для биотестов с энхитреидами при оценке токсичности компостированных ОСВ.** В экспериментах с компостами ОСВ апробированы методические подходы определения токсичности, которые представлены выше, изученные с конкретными токсикантами (метафос, Cd). Характеристика состава компоста представлена в таблице. Многие из представленных компонентов при биотестировании могут оказывать токсическое действие на выживаемость культуры энхитреид. Установлено, что внесение азотных и фосфорных удобрений ведёт к превышению оптимального (природного) уровня обитания энхитреид и снижает их обилие в почве [22, 23].

На рисунке 3 показан общий тренд снижения выживаемости Annelida (кольчатых червей) при увеличении доли осадка в составе искусственной почвы. Сравнительный анализ компостов показывает, что, наиболее вероятно, токсичность компоста ОСВ 1 в сравнении с компостом ОСВ 2 обусловлена высоким содержанием общего азота, и его легкогидролизуемыми формами (3,7 и 1,89% соответственно), которые значительно превышают эти показатели естественной среды обитания энхитреид (1,8 и 0,56) [24]. Очевидно, что этот показатель даёт больший вклад в интегральную токсичность, чем содержание контаминантов, так как содержание ТМ в компосте ОСВ 2 выше. Эффективность действия антидота-2 на фоне высоких концентраций ОСВ представлена на рисунке 3.

Действие антидотов на фоне компоста ОСВ 1 не проявилось, так как их влияние не распро-

страняется на фракцию легкогидролизуемого азота. В то же время, действие антидота-2 на фоне компоста 2 понижает уровень токсичности, что, в силу специфичности антидота, указывает на токсичность ТМ, проявляющуюся в условиях искусственной почвы. Защитное действие антидота ТМ явно начинает проявляться на высоком уровне концентраций компоста ОСВ в почве > 500 мг/кг.

Различие между уровнями выживаемости тест-культуры в опытных вариантах с концентрацией ОСВ 50% без (4,0±0,6 шт.) и с антидотом-2 (6,5±1,2 шт.) статистически значимо ( $HCP_{0,05} = 2,03$ ). В вариантах, где субстрат был представлен только ОСВ (100%), выживаемость *E. albidus* без антидота 2 и с ним соответствовала значениям 3,6±0,7 и 6,1±1,8 шт. соответственно. Основным результатом, отражённым на рисунке 3, является разница в выживаемости и, соответственно, в токсичности

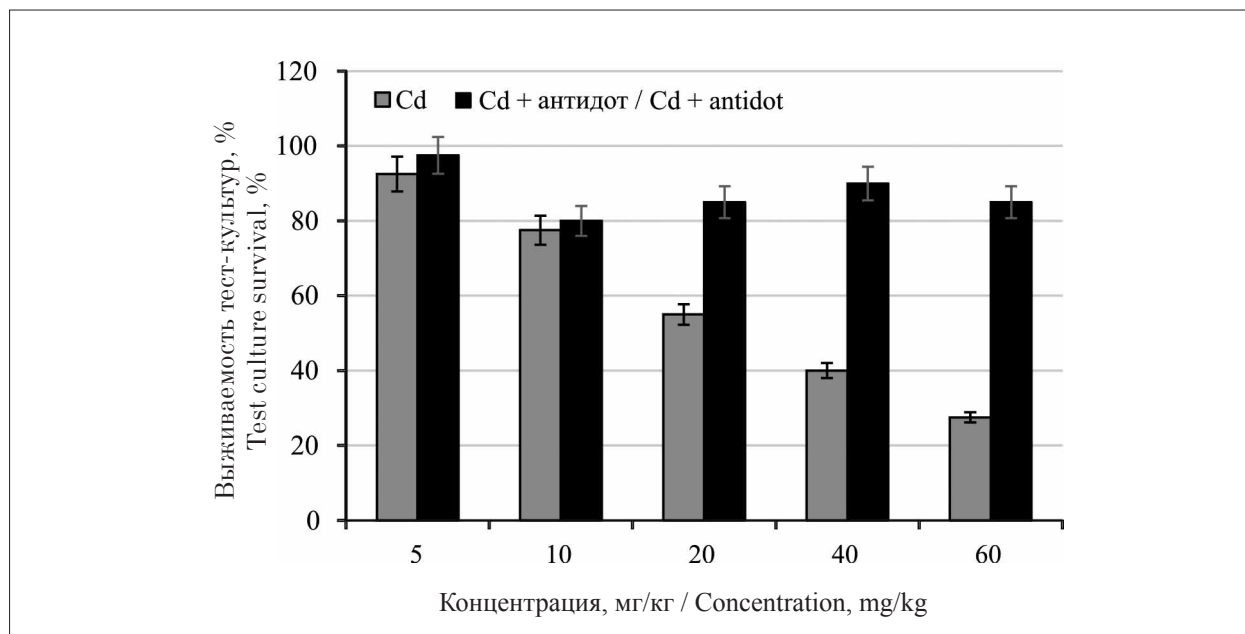
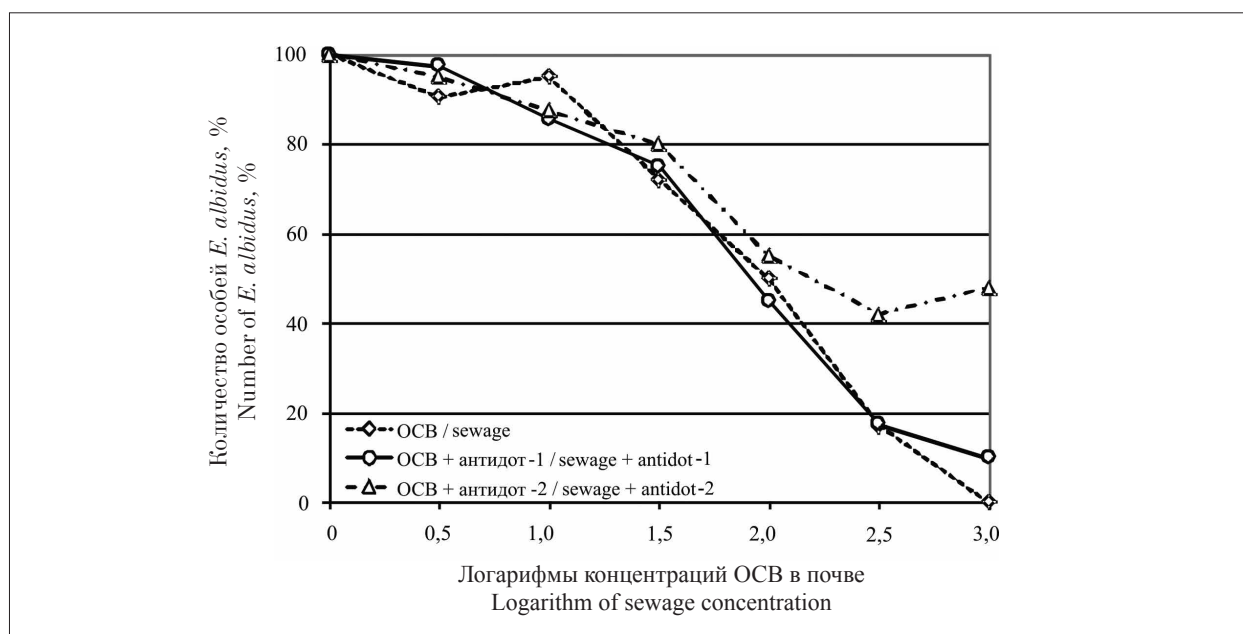


Рис. 2. Действие димеркаптопропансульфоната натрия и кадмия на выживаемость *E. albidus*  
 Fig. 2. Effect of dimercaptopropanesulfonate sodium and cadmium on survivability of *E. albidus*

Таблица / Table

Химический состав компостируемого осадка сточных вод  
 Chemical composition of composted sewage

Компосты ОСВ Compost sludge sewage	Характеристика состава / The characteristics of the composition										
	Cu	Zn	Pb	Cd	As	C <sub>орг.</sub> C <sub>org</sub>	N <sub>общ.</sub> N <sub>total</sub>	N <sub>гидрол.</sub> N <sub>hydrolytic</sub>	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	зола ash	pH, ед. units
	мг/кг сухого вещества mg/kg (dry of substance)					%					
ОСВ 1 Sewage 1	425	1743	71	8	11	52,0	3,7	1,89	5,27	48,3	7,4
ОСВ 2 Sewage 2	503	2144	92	10	14	48,1	1,8	0,56	6,71	52,4	7,4



**Рис. 3.** Влияние антидотов на выживаемость *E. albidus* в компостах ОСВ  
**Fig. 3.** The effect of antidotes on the survivability of *E. albidus* in compost of sewage

между вариантами ОСВ 2 и ОСВ 2 + антидот-2 при концентрациях ОСВ в субстрате 50 и 100%. Снижение токсичности по тест-показателю выживаемости *E. albidus* в вариантах с высоким содержанием ОСВ 2 (50% и более) и применением антидота-2 косвенно указывают на присутствие ТМ в исследуемом субстрате.

Влияния антидота 1 не проявилось, что также позволяет предполагать как низкий уровень биодоступности фосфорорганики, так и отсутствие токсичности фосфорсодержащих веществ в данном субстрате.

### Заклучение

Результаты проведённых экспериментов свидетельствуют о целесообразности внедрения метода с использованием энхитреид для оценки токсичности гетерогенного отхода ОСВ. Серьёзные ограничения, предъявляемые к биологическим методам, связанные с «неопределённостью» причины токсичности, требуют методического развития. Модификация биотестирования с применением предварительной обработки энхитреид специфичными к поллютантам реагентами может повысить информативность оценки химического характера загрязнения.

### References

1. Terekhova V.A. Soil bioassay: problems and approaches // Eurasian Soil Science. 2011. V. 44. No. 2. P. 173–179. doi: 10.1134/S1064229311020141

2. Mayachkina N.V., Chugunova M.V. Peculiarities of soil biotests to evaluate soil ecotoxicity // Vestnik Nizhegorodskogo universiteta im. N.I. Lobachevskogo. Biologiya. 2009. No. 1. P. 84–93 (in Russian).

3. Domene X. Methodologies using soil organisms for the ecotoxicological assessment of organic wastes. Bellaterra: Universitat Autònoma de Barcelona, 2007. 217 p.

4. Amorim M.J., Rombke J., Scheffczyk A., Soares A.M. Effect of different soil types on the enchytraeids *Enchytraeus albidus* and *Enchytraeus luxuriosus* using the herbicide Phenmedipham // Chemosphere. 2005. V. 61 (8). P. 1102–1114. doi: 10.1016/j.chemosphere.2005.03.048

5. He Z.L., Yang X.E., Stoffella P.J. Trace elements in agroecosystems and impacts on the environment // Journal of Trace elements in Medicine and Biology. 2005. V. 19. No. 2–3. P. 125–140. doi: 10.1016/j.jtemb.2005.02.010

6. Roembke J., Schmelz R.M., Pelosi C. Effects of organic pesticides on enchytraeids (Oligochaeta) in agroecosystems: laboratory and higher-tier tests // Frontiers in Environmental Science. 2017. V. 5. Article No. 20. doi: 10.3389/fenvs.2017.00020

7. Goncalves M.F., Bicho R.C., Rema A., Soares A.M., Faustino A.M., Amorim M.J. Development of an embryotoxicity test for *Enchytraeus crypticus* – the effect of Cd // Chemosphere. 2015. V. 139. P. 386–392. doi: 10.1016/j.chemosphere.2015.07.021

8. Zhang L., van Gestel C.A., Cornelis A.M. The toxicity of different lead salts to *Enchytraeus crypticus* in relation to bioavailability in soil // Environ Toxicol Chem. 2017. V. 36 (8). P. 2083–2091. doi: 10.1002/etc.3738

9. Leon Paumen M. Invertebrate life cycle responses to PAC exposure. Amsterdam: Universiteit van Amsterdam, 2009. 148 p.

10. Filimonova Z.V., Pokarzhevskii A.D. Enchytraeid *Enchytraeus crypticus* as a test organism for crude oil con-

tamination of soil // Bull. Environ. Contam. Toxicol. 2000. V. 65 (3). P. 407–414. doi: 10.1007/s0012800142

11. Loureiro S., Amorim M.J., Campos B., Rodrigues S.M., Soares A.M. Assessing joint toxicity of chemicals in *Enchytraeus albidus* (Enchytraeidae) and *Porcellionides pruinosus* (Isopoda) using avoidance behaviour as an endpoint // Environ Pollut. 2009. V. 157 (2). P. 625–636. doi: 10.1016/j.envpol.2008.08.010

12. Sinha R., Bharambe G., Ryan D. Converting wasteland into wonderland by earthworms – a low-cost nature's technology for soil remediation: a case study of vermiremediation of PAHs contaminated soil // Environmentalist. 2008. V. 28. No. 4. P. 466–475. doi: 10.1007/s10669-008-9171-7

13. Kominko H., Gorazda K., Wzorek Z., Wojtas K. Sustainable management of sewage sludge for the production of organo-mineral fertilizers // Waste and Biomass Valorization. 2018. V. 9. No. 10. P. 1817–1826. doi: 10.1007/s12649-017-9942-9

14. Tikhonenko V.M. Influence of armine and dipyroxime on the level of nikotinamide coenzymes and adenyl nucleotides in the myocardium and liver of rats // Farmakologiya i toksikologiya. 1982. No. 1. P. 26–29 (in Russian).

15. Medical toxicology / Ed. E.A. Luzhnikov. Moskva: GEOTAR-Media, 2012. 928 p. (in Russian).

16. Measurement of the mass fraction of elements (As, Cd, Co, Cr, Cu, Hg, Mn, Ni, Pb, V, Zn) in soil, ground, sediment and wastewater samples. Metodika M 03-07-2014. PND F 16.1:2:2.2:2.3.63-09 (izdanie 2014 goda). Moskva: OOO "Lyumeks", 2014. (in Russian).

17. Guidelines for the determination of arsenic in soils by photometric method. Center of agrochemical service. Moskva: TsINAO, 1993. 20 p. (in Russian).

18. Saxe J.K., Impellitteri C.A., Peijnenburg W.J., Allen H.E. Novel model describing trace metal concentrations in the earthworm, *Eisenia andrei* // Environ Sci Technol. 2001. V. 35. P. 4522–4529. doi: 10.1021/es0109038

19. Jager T., Fleuren R.H., Hogendoorn E.A., de Korte G. Elucidating the routes of exposure for organic chemicals in the earthworm, *Eisenia andrei* (Oligochaeta) // Environ Sci Technol. 2003. V. 37. P. 3399–3404. doi: 10.1021/es0340578

20. Vijver M.G., Wolterbeek H.T., Vink J.P., van Gestel C.A. Surface adsorption of metals onto the earthworm *Lumbricus rubellus* and the isopod *Porcellio scaber* is negligible compared to absorption in the body // Science of the Total Environment. 2005. V. 340 (1–3). P. 271–280. doi: 10.1016/j.scitotenv.2004.12.018

21. Skugoreva S.G., Ashihmina T.Ya., Fokina A.I., Lyalina E.I. Chemical groups of toxic effect of heavy metals (review) // Theoretical and Applied Ecology. 2016. No 1. P. 4–13 (in Russian). doi: 10.25750/1995-4301-2016-1-014-019

22. Abrahamsen G., Thompson W.N. Long term study of the Enchytraeid (Oligochaeta) fauna of a mixed coniferous forest and effect of urea fertilization // Oikos. 1979. V. 32. No. 3. P. 318–327. doi: 10.2307/3544742

23. Thompson A.M. Enchytraeids and nitrogen: the effects of nitrogen on enchytraeid populations and the influence of enchytraeids on nitrogen translocation in soil: A thesis submitted for the degree of Ph.D. Durham University, 2005. 45 p.

24. Dezi S., Lal D., Lal V.B. Enchytraeids sustainability and tolerance against agro-chemicals in *Zea mays* cropland // The Bioskan. 2013. V. 8. No. 1. P. 213–217.