

LUMBRICUS RUBELLUS – ЕФЕКАТ НА БИОРЕМЕДИЈАЦИЈУ ЗЕМЉИШТА КОНТАМИНОВАНОГ ПЕНДИМЕТАЛИНОМ

Игор Милуновић¹, Ивица Радовић², Војислав Тркуља³, Биљана Лубарда⁴

¹Републичка управа за инспекцијске послове, Бања Лука и Природно-математички факултет, Бања Лука

²Факултет за безбедност, Београд

³ЈУ Пољопривредни институт Републике Српске, Бања Лука

⁴Природно-математички факултет, Бања Лука

Abstract

MILUNOVIĆ, I., I. RADOVIĆ, V. TRKULJA, Biljana LUBARDA: LUMBRICUS RUBELLUS – THE EFFECT OF BIO-REMEDIATION ON SOIL SUBSTRATE CONTAMINATED WITH PENDIMETHALIN. [¹Republic Administration for Inspection Activities, Banja Luka and Faculty of Natural Science Banja Luka; ² Faculty of Security, Belgrade; ³PI Agriculture Institute of Republic of Srpska, Banja Luka; ⁴Faculty of Natural Science, Banja Luka]

Today there is a large number of methods for remediation of contaminated soil. Along with mechanical and chemical refinement of soil, living organisms (plants, animals, microorganisms) are often used for remediation of soil. The aim of this experiment was to establish the influence of species *Lumbricus rubellus* on bio-remediation processes, i.e. their influence on the ‘cleansing’ of soil substrate contaminated with the herbicide Stomp 330 E. An artificial soil was used as a soil substrate, which had been prepared in accordance with a recommendation from the standard ISO 17512-1. The artificial soil consists of kaolin clay 70%, quartz sand 20% and peat 10%. The herbicide used as a contaminant was STOMP 330 E with the active chemical material pendimethalin. Based on the results of the research it was established that the greatest bio-remediation effect was observed in the series of experiments that were contaminated with 3 µl/kg of pendimethalin. By increasing the concentration of the contaminant by only 2 µl/kg, the effect of bio-remediation is decreased by 12.44%, while with the increase of 4 µl/kg, even by 31.71%.

Key words: *Lumbricus rubellus*, bio-remediation, artificially soil substrate, STOMP 330 E, pendimethalin

Сажетак

Данас је у употреби велики број метода за ремедијацију контаминованих земљишта. Осим механичког и хемијског начина пречишћавања земљишта, врло често се користе живи организми (биљке, животиње, микроорганизми) у процесу ремедијације земљишта. Циљ овог рада је био да се утврди у ком проценту врста *Lumbricus rubellus* утиче на биоремедијацијске процесе, односно њихов утицај на „чишћење” земљишног супстрата контаминованог хербицидом Stomp 330 E. Као земљишни супстрат коришћен је вјештачки супстрат који је припремљен према препоруци из стандарда ISO 17512-1. Састојао се од каолинске глине, кварцног пијеска и тресета у процентуалном односу (70 : 20 : 10). Хербицид који је коришћен као контаминант је STOMP 330 E, чија је активна материја пендиметалин. На основу резултата истраживања утврђено је да врста *L. rubellus* има врло низак праг толеранције према пендиметалину, при чему је утврђено да је највећи ефекат биоремедијације забиљежен у серијама експеримента који су били контаминовани

са 3 $\mu\text{l/kg}$ пендиметалина. Повећањем концентрације контаминанта за свега 2 $\mu\text{l/kg}$, ефекат биоремедијације се смањује за 12,44%, а при повећању за 4 $\mu\text{l/kg}$, чак за 31,71%.

Кључне ријечи: *Lumbricus rubellus*, биоремедијација, вјештачки супстрат, STOMP 330 E, пендиметалин

УВОД

Представници фамилије *Lumbricidae* осим тога што често служе као тест организми у екотоксиколошким тестовима имају још једну важну еколошку улогу. Наиме, утврђено је да ови представници педофауне својом активношћу могу у земљишту подстицати разлагање различитих синтетичких материја, пестицида, минералних ђубрива и других органских микрозагађивача као што су полициклични ароматични угљоводоници (Contreras-Ramos *et al.*, 2006.; Sinha *et al.*, 2008.). *Lumbricidae* се користе за опоравак земље, мелиорацију и рехабилитацију „нефункционалних“ земљишта као што су земљишта сиромашна минералима, рудници површинског копа, затворене депоније и огољени тресет (Haimi, 2000.; Lowe *et Butt*, 2003. и Butt *et al.*, 2004.). Ова биотехнологија, под називом биоремедијација, а која се одвија уз помоћ кишних глиста често се означава као вермиремедијација. Данас је широко распрострањена у свијету, као јефтина и прикладна технологија за санирање органског загађења у земљишту.

Биоремедијација помоћу кишних глиста обухвата:

1. директан утицај кишних глиста у контаминованом земљишту (Schaefer *et Filser*, 2007.),
2. заједнички утицај кишних глиста и других органских материја (као што је компост) на контаминована земљишта (Cecanti *et al.*, 2006.),
3. утицај кишних глиста на контаминована земљишта у режиму њихове исхране (Getliff *et al.*, 2002.), и
4. индиректно коришћење кишних глиста, односно коришћење њихових излучевина (екскремената) које настају процесом варења. Екскременти садрже високу концентрацију разграђених микроба, а самим тим посједују високу катаболичку активност (Alvarez-Bernal *et al.*, 2006.) Teotia *et al.*, (1950) наводе податак да је у екскременту утврђен број од 32 милиона бактерија по граму, за разлику од околног земљишта гдје је утврђено 6-9 милиона.

Имајући у виду наведено, циљ овог рада је био да се кроз серију експеримената утврди у ком проценту врста *Lumbricus rubellus* утиче на биоремедијацијске процесе, односно њихов утицај на „чишћење“ земљишног супстрата контаминованог хербицидом Stomp 330 E.

МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

Стандардни тест ISO 17512–1 је послужио као методолошка основа за извођење експеримената у овом раду. Према овом стандарду, прописан је начин (генерална методологија) који подразумијева коришћење стаклених тестних посуда подјељених на два једнака дијела помоћу вертикално положеног граничника. Тестни контејнери су конструисани у виду квадратних стаклених кутија димензија 20 x 20 x 10 cm. Концепт испитивања утицаја *L. rubellus* на резидуе пендиметалина је рађен у три варијанте. У првој варијанти коришћен је земљишни супстрат са три различите концентрације

пендиметалина без присуства кишних глиста. Друга варијанта се састојала од земљишног супстрата контаминованог са три различите концентрације пендиметалина на начин да је једна половина тестног контејнера садржавала осим хербицида и јединке кишних глиста, док у другој половини није било кишних глиста, само хербицид идентичне концентрације. Трећа варијанта је представљала земљишни супстрат без присуства глиста и без садржаја пестицида – контролна варијанта. Током експеримента влажност земљишног супстрата је била идентична. Узорци земљишног супстрата за анализе су узимани на начин да је сваки третман узоркован чистом стерилном шпатулом која је претходно стерилисана етил алкохолом. Узет је просјечан узорак по третману, тежине око 300 g који је формиран од узорака узетих по дијагоналама сваког третмана (пет тачака: једна из средине експерименталног контејнера и четири са средине дијагонала, с тим да је једна тачка обухватала цијелу дубину контејнера).

Испитивање резидуа пендиметалина је рађено по методи течно-чврсте екстракције за одређивање пестицида у узорцима земљишта (Ђуровић и Ђорђевић, 2010). Начин припреме узорака за одређивање остатака пендиметалина је био следећи: узорци земљишта (10 g) су хомогенизовани два пута са по 15 ml смјеше метанол : ацетон = 1:1 (30 мин., ротациона мјешалица), уз додатак 2 g Na₂SO₄ (анх.) (сушен 24 часа на 130°C). Након центрифугирања (15 минута., 4000 rpm) и филтрирања екстракта, филтрат је упарен до сувог остатка (ротациони упаривач, 35°C), који је растворен у 5 ml смјеше етил ацетат : ацетон = 4:1, послије чега је 1 ml добијеног раствора унесен у хроматографску колону која је претходно напуњена са 1 g Na₂SO₄ (анх.) (сушен 24 часа на 130°C) и 5 g флорисила (жарен 4 часа на 600°C послије чега је додатно сушен 5 часова на 130°C). Флорисил је унесен у колону са 30 ml смјеше етил ацетат : ацетон = 4:1. Елуирање пендиметалина из колоне је вршено са 30 ml смјеше етил ацетат : ацетон = 4:1. Елуат је упарен до сувог остатка, који је растворен у 5 ml ацетона, од чега је 1 µl ињектован у гасно-масени спектрометар (GC - MS).

GC - MS услови:

- VF-5 ms капиларна колона (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm),
- температура ињектора – 260°C,
- температурни програм GC-а: 150°C, загријавање до 190°C брзином од 12°C/min; након 2 min., загријавање до 250°C брзином од 20°C/min (изотермално 1 min.),
- као носећи гас коришћен је хелијум (проток од 1 ml/min.),
- масени спектрометар је радио у EI/SIM моду температуре ion trap-а и transferline-а су биле 220°C и 250°C, респективно и
- квантификација пендиметалина је рађена са фрагментом 252 (m/z).

Биолошки материјал се састојао од одраслих јединки врсте *Lumbricus rubellus*. Јединке су биле старе најмање два мјесеца, са развијеним клителумом, тежине преко 300 mg и дужине преко 7 cm. Прије увођења у контејнере јединке су испиране водом, затим вагане и сушене на упијајућем филтер папиру током 24 сата. У сваком експерименталном контејнеру постављено је по 10 јединки. Експеримент је проведен на супстрату који је такође припремљен према препоруци из стандарда ISO 17512-1. Састојао се од каолинске глине у проценту од 70% (у свом саставу је садржавала око 30% каолина), кварцног пијеска (веома мале гранулације) у проценту од 20% и тресета у проценту од 10%.

Влажност супстрата је током извођења експеримента подешавана на 60% у односу на ретенциони водни капацитет, а рН вриједност на 5.

Као контаминант је коришћен хербицид Stomp 330 Е са активном материјом пендиметалин (произвођач „BASF”, Њемачка). Пендиметалин је селективни хербицид из групе динитроанилина намијењен за премергентну контролу једногодишњих травних и широколисних корова (Tomlin, 2000; Тркуља и сар., 2012). Хербицид је дозиран у земљишни супстрат микропипетама према тачно прорачунатим количинама.

РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА

Истраживања су рађена на серији од 22 контејнера при чему су сви имали различите третмане који су унапријед утврђени. Прва три контејнера третирана су различитим концентрацијама пендиметалина (3 $\mu\text{l/kg}$, 5 $\mu\text{l/kg}$ и 7 $\mu\text{l/kg}$), при чему је непосредно послје загађивања вршена анализа садржаја резидуа пестицида у земљишту. Преостали контејнери такође су контаминовани истим концентрацијама поменутог хербицида, с том разликом што се у једној половини сваког контејнера налазило по 10 јединки врсте *Lumbricus rubellus*. Анализа садржаја резидуа пендиметалина овог дијела серије контејнера рађена је након 21 дан. Основа приликом избора концентрација које су коришћене у овом огледу била је препоручена концентрација произвођача за препарат Stomp 330 Е (5 $\mu\text{l/kg}$), а друге двије концентрације су 3 $\mu\text{l/kg}$ (40% мања од препоручене), односно 7 $\mu\text{l/kg}$ (40% већа од препоручене). Анализом садржаја резидуа пендиметалина у прва три контејнера (прва серија) констатовано је да је њихова вриједност у складу са концентрацијом пестицида којом је третиран супстрат (таб. 1 и граф. 1). Сасвим је очекивано да се највећа концентрација резидуа пендиметалина (2,29 $\mu\text{l/kg}$) налази у оном контејнеру који је контаминован са 7 $\mu\text{l/kg}$, а најмања (0,97 $\mu\text{l/kg}$) у контејнеру са 3 $\mu\text{l/kg}$.

Слични резултати добијени су приликом одређивања садржаја резидуа пендиметалина у осталим контејнерима, тачније у оним дијеловима у којима се нису налазиле јединке *Lumbricus rubellus*. Супстрати који су били третиран са 3 $\mu\text{l/kg}$ пендиметалина, имали су вриједности резидуа у распону од 0,880 $\mu\text{g/g}$ до 0,899 $\mu\text{g/g}$, односно просјечан узорак је имао вриједност 0,887 $\mu\text{g/g}$. Са 5 $\mu\text{l/kg}$ вриједности резидуа су варирале од 1,444 $\mu\text{g/g}$ до 1,557 $\mu\text{g/g}$ (просјечан узорак је имао вриједност 1,492 $\mu\text{g/g}$), док је са 7 $\mu\text{l/kg}$ вриједност резидуа кретала се од 2,149 $\mu\text{g/g}$ до 2,267 $\mu\text{g/g}$, тј. просјечан узорак је имао вриједност 2,223 $\mu\text{g/g}$ (таб. 1 и граф. 1). Нешто ниже вриједности резидуа пендиметалина које су забиљежене у овим серијама контејнера резултат су микробиолшке активности, а дјелимично и испаравања у времену од 3 седмице колико је и трајао оглед.

Ипак, најважнији резултат који је добијен овим експериментом јесте да је најнижа вриједност садржаја резидуа пендиметалина детектована у дијеловима контејнера у којима су се налазиле јединке *Lumbricus rubellus*. Ако се упореде средње вриједности резидуа у дијеловима контејнера са глистама (0,532 $\mu\text{g/g}$) и без глиста (0,887 $\mu\text{g/g}$), а које су третиране са 3 $\mu\text{l/kg}$ контаминанта, може се уочити да је утицај *Lumbricus rubellus* на убрзање процеса биоремедијације **веома изражен**. Ефекат биоремедијације забиљежен у овој серији контаминованих супстрата износи 40,03%, што представља високу вриједност, ако се има у виду да је дужина трајања овог процеса била релативно кратка (21 дан).

Међутим, поређењем средњих вриједности у супстратима контаминованим са 5 $\mu\text{l/kg}$, односно 7 $\mu\text{l/kg}$ пендиметалина, забиљежени су нешто нижи ефекти

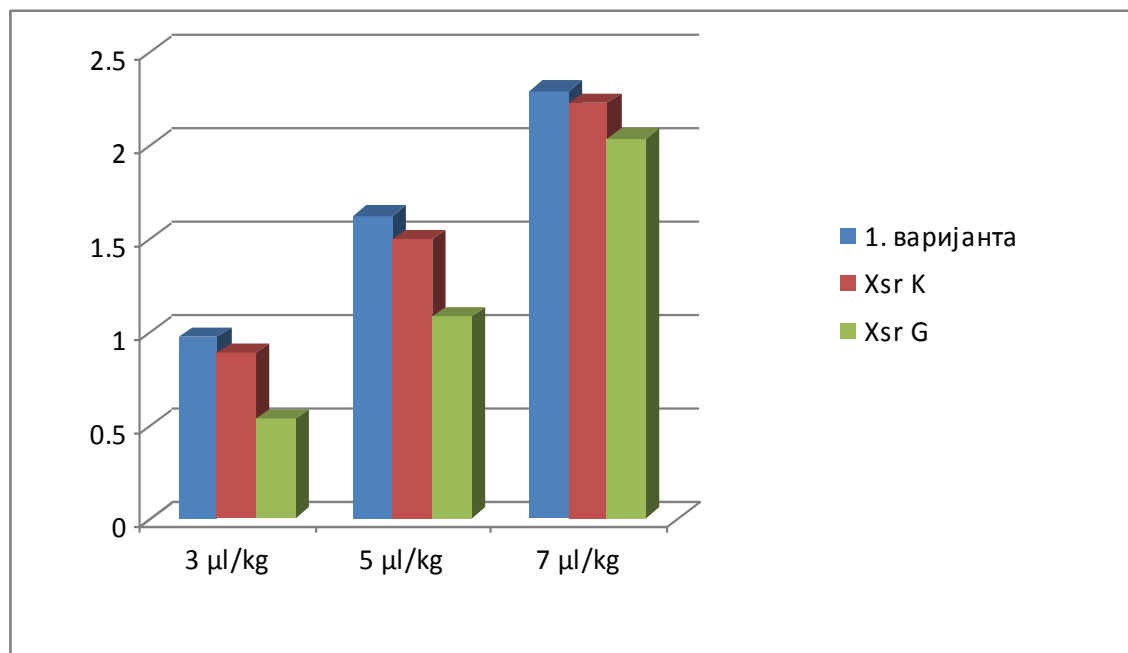
биоремедијације. Наиме, у серији супстрата третираних са 5 $\mu\text{l}/\text{kg}$ ефекат биоремедијације износио је 27,59%, а у серији са 7 $\mu\text{l}/\text{kg}$ свега 8,32%.

Табела 1. Вриједности детектованих резидуа пендиметалина у земљишном супстрату контаминованим различитим концентрацијама пендиметалина

Серија	Ознака узорка	Детектовано резидуа пендиметал. ($\mu\text{g}/\text{g}$)	\bar{x} K \bar{x} G	Ефекат биоремедијације
Прва серија	C ₁ -3 $\mu\text{l}/\text{kg}$	0,97		
	C ₂ -5 $\mu\text{l}/\text{kg}$	1,62		
	C ₃ -7 $\mu\text{l}/\text{kg}$	2,29		
Друга серија концентрација 3 $\mu\text{l}/\text{kg}$ (ознака P/1)	P/1/I без глиста	0,880	\bar{x} K ₁ = 0,887	40,03%
	P/1/I са глистама	0,539		
	P/1/II без глиста	0,899	\bar{x} G ₁ = 0,532	
	P/1/II са глистама	0,534		
	P/1/III без глиста	0,884		
	P/1/III са глистама	0,524		
Друга серија концентрација 5 $\mu\text{l}/\text{kg}$ (ознака P/2)	P/2/I- без глиста	1,444	\bar{x} K ₂ = 1,492	27,59%
	P/2/I- са глистама	1,082		
	P/2/II- без глиста	1,557	\bar{x} G ₂ =1,079	
	P/2/II- са глистама	1,077		
	P/2/III- без глиста	1,475		
	P/2/III-са глистама	1,079		
Друга серија концентрација 7 $\mu\text{l}/\text{kg}$ (ознака P/3)	P/3/I- без глиста	2,255	\bar{x} K ₃ = 2,223	8,32%
	P/3/I- са глистама	1,989		
	P/3/II- без глиста	2,267	\bar{x} G ₃ = 2,036	
	P/3/II- са глистама	2,024		
	P/3/III- без глиста	2,149		
	P/3/III-са глистама	2,097		

\bar{x} K – средња вриједност резидуа пендиметалина за земљишни супстрат без кишних глиста

\bar{x} G – средња вриједност резидуа пендиметалина за земљишни супстрат са кишним глистам

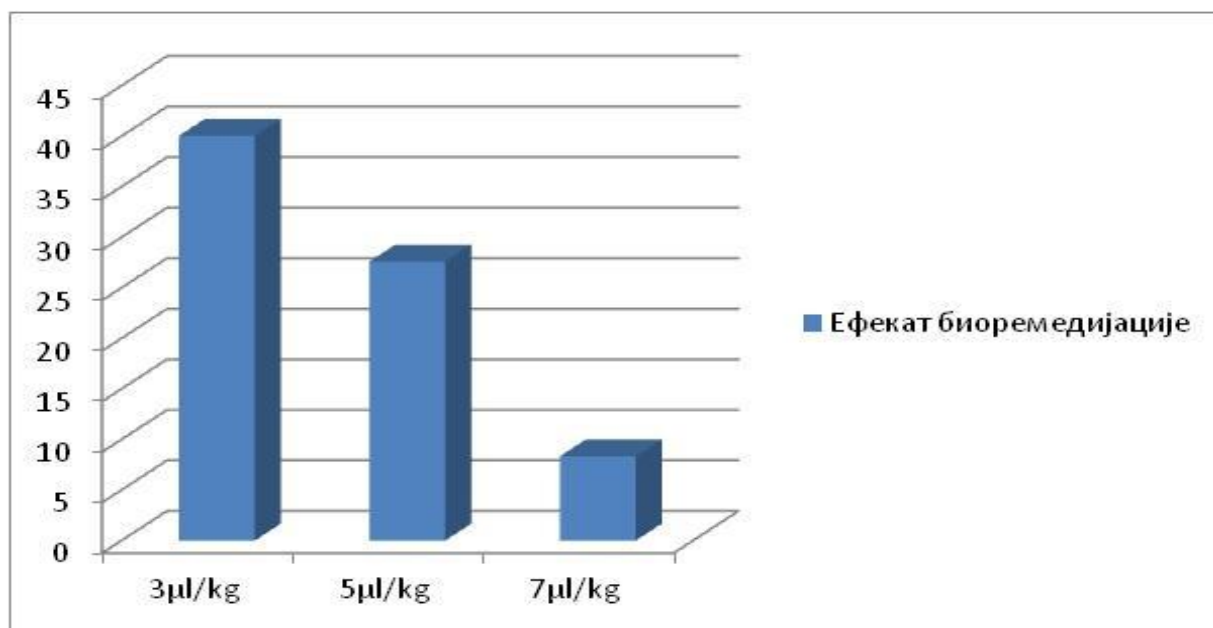


Графикон 1. Вриједности детектованих резидуа пендиметалина у серијама концентрација, као и у земљишном супстрату без присуства (K) и са присуством глиста (G)

Овако добијени резултати указују да врста *Lumbricus rubellus* има врло низак праг толеранције према токсичним материјама, у конкретном случају према пендиметалину. Експериментом је показано да се повећањем концентрације контаминанта за свега 2 $\mu\text{l}/\text{kg}$, ефекат биоремедијације смањује за 12,44%, а при повећању за 4 $\mu\text{l}/\text{kg}$, чак за 31,71%. И поред овако примјетног смањења ефекта биоремедијације треба нагласити да је улога кишних глиста, тачније врсте *Lumbricus rubellus* у овом процесу изузетно важна, поготово ако се упореде резултати вриједности резидуа пендиметалина које су анализирале непосредно после контаминације и након 21 дана.

Кишне глисте мијењају структуру земљишта тако што прерађују честице земљишта, остављају детритус и слуз који представљају храну за микробну популацију и на тај начин стимулишу повећање микробне популације земљишта (Lavelle *et al.* 2004; Tiunov *et al.* 1997). Martinkosky, L. (2015) је серијом експеримената, које је проводио на земљишту које је контаминовано сировом нафтом, са врстама *Eisenia foetida* и *Aporrectodea caliginosa*, утврдио да повећања бактеријске популације посредством кишних глиста могу послужити деградацију сирове нафте (мјерено бактеријским концентрацијама ДНК).

Сличне резултате у вези са ефикасношћу врсте *Lumbricus rubellus* у процесима биоремедијације наводе и Милуновић и сар. (2009) који су изучавали биоремедијацијске ефекте са дериватима нафте као контаминантом.



Графикон 2. Вриједности ефеката биоремедијације при различитим концентрацијама хербицида изражен у %

ЗАКЉУЧАК

На основу резултата добијених током истраживања проведених у оквиру овог рада, могу се извести закључци да при истраживању утицаја врсте *L. rubellus* на резидуе пендиметалина у земљишном супстрату (биоремедијацијски тестови) ова врста има врло низак праг толеранције према пендиметалину, као и да је највећи ефекат биоремедијације забиљежен у серијама експеримента који су били контаминовани са 3 µl/kg пендиметалина. Такође је утврђено да повећањем концентрације контаминанта за свега 2 µl/kg ефекат биоремедијације се смањује за 12,44%, а при повећању за 4 µl/kg, чак за 31,71%. Иако је евидентно смањење ефекта биоремедијације, улога кишних глиста, тачније врсте *Lumbricus rubellus* у овом процесу је од велике важности.

Како је *Lumbricus rubellus* и у овом огледу показала највеће ефекте биоремедијације при мањим концентрацијама пендиметалина (3 µl/kg), које су нешто ниже од препоручене концентрације произвођача која износи 5 µl/kg, важно је истаћи да би практична употреба ове врсте кишних глиста била веома ефикасна „за чишћење“ земљишта при наведеним концентрацијама.

Посебно велики допринос кишних глиста у смислу убрзања процеса биоремедијације земљишта контаминованог пестицидима је у томе што оне својом активношћу повећавају аерираност и порозност земљишта и убрзавају дистрибуцију микроорганизама. Резултати овога рада могу бити основа за даље изучавање процеса биоремедијације помоћу врсте *Lumbricus rubellus*.

ЛИТЕРАТУРА

1. Alvarez-Bernal, D., Garcia-Diaz, E. L., Contreras-Ramos, S. M. & Dendooven, L. (2006): Dissipation of polycyclic aromatic hydrocarbons from soil added with manure or vermicompost; *J. of Chemosphere*; Vol. 65(9), 1642-51.
2. Butt, K. R., Lowe, C. N., Frederickson, J. & Moffat, A. J. (2004): The development of sustainable earthworm populations at Calvert landfill site, UK; *J. of Land Degradation & Development*; Vol. 15, 27-36.
3. Ceccanti, B., Masciandaro, G., Garcia, C. Macci, C. & Doni, S. (2006): Soil bioremediation: combination of earthworms and compost for the ecological remediation of a hydrocarbon polluted soil, *J. of Water & Air Soil Pollution*; Vol. 177, 383-397.
4. Contreras-Ramos, Silvia, M., Alvarez-Bernal, Dioselina & Dendooven Luc (2006): *Eisenia fetida* Increased Removal of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) from Soil; *Environmental Pollution*; Vol. 141, 396-401; Elsevier Pub.
5. Ђуровић, Р., Ђорђевић, Т. (2010): Метода течно-чврсте екстракције у одређивању пестицида у узорцима земљишта, X Саветовање о заштити биља, Златибор.
6. Getliff, J., McEwan, G., Ross, S., Richards, R. & Norman, M. (2002): Drilling fluid design and the use of vermiculture for the remediation of drill cuttings; AADE Technology Conference “Drilling Fluids and Waste Management”.
7. Haimi, J. (2000): Decomposer animals and bioremediation of soils; *J. of Environmental Pollution*; Vol. 107, 233-238.
8. ISO 17512-1 (2008): Soil quality - Avoidance test for determining the quality of soils and effects of chemicals on behaviour - Part 1: Test with earthworms (*Eisenia fetida* and *Eisenia andrei*).

9. Lavelle, P. et al., (2004): Effects of earthworms on soil organic matter and nutrient dynamics at a landscape scale over decades. In C. Edwards, ed. *Earthworm Ecology*. Boca Raton, FL: CRC Press LLC, pp. 145–160.
10. Lowe, C.N., Butt, K.R. (2003): Inoculation of earthworms into reclaimed soils: experiences from Britain; Proc. Of Ninth International Waste Management and Landfill Symposium.
11. Martinkosky, L., (2015): Innovative use of earthworms for the remediation of soil contaminated with crude oil, A thesis of Master of Science, University of Washington, pp. 43-56.
12. Милуновић, И., Радовић, И., Врвић, М. М. (2009): Потенцијал убрзања биоремедијације земљишта контаминованог дизел горивом D₂ помоћу врсте *Lumbricus rubellus*. Зборник радова. III Међународни конгрес "Екологија, здравље, рад, спорт". Бања Лука.
13. Милуновић, И. (2013): *Lumbricus terrestris* и *Lumbricus rubellus* (Oligochaeta, Annelida) као тест организми за екотоксиколошко процјењивање квалитета (пољопривредног) земљишта контаминираним хербицидима Стомп 330 Е и Радазин Т 50. Докторска дисертација, Природно-математички факултет, Бања Лука.
14. Schaefer M. & Filser, J. (2007). The influence of earthworms and organic additives on the biodegradation of oil contaminated soil; *J. of Applied Soil Ecology*; Vol. 36 , 53-62.
15. Sinha, Rajiv K., Gokul Bharambe & David Ryan (2008): Converting Wasteland into Wonderland By Earthworms: A Low-Cost Nature's Technology for Soil Remediation : A Case Study of Vermiremediation of PAH Contaminated Soil; *The Environmentalist*; UK; Vol. 28, 466 - 475; Published Online 14 May 2008, Springer, USA.
16. Teotia SP, Duley FL, McCalla TM (1950): Effect of stubble mulching on number and activity of earthworms. *Agricultural Experiment Station Research Bulletin*. University of Nebraska College of Agriculture; p. 165. Lincoln, NE.
17. Tiunov, A., Dobrovol'skaya, T. & Polyanskaya, L. (1997): Microbial Community of the *Lumbricus terrestris* L. Earthworm Burrow Walls. *Microbiology*, 66(3), pp.349–353.
18. Tomlin, C. (2000): (Ed.) *The Pesticide Manual*, 12th Ed. British Crop Protection Council, UK.
19. Тркуља, В., Ивандија, Т., Марић Бранимира (2012): Средства за заштиту биља 2012. године. *Гласник заштите биља* 2-3: 1–283, Загреб.

Примљено: 26. 11. 2015.

Одобрено: 28. 04. 2016.