

ЕКОТОКСИКОЛОШКИ ЕФЕКТИ ДИЗЕЛ ГОРИВА D₂ НА ВРСТУ *Lumbricus rubellus* И ЊЕНО КОРИШЋЕЊЕ У ПРОЦЕСИМА БИОРЕМЕДИЈАЦИЈЕ

Милуновић Игор¹, Лубарда Биљана², Радовић Ивица³

¹ Републичка управа за инспекцијске послове,

Инспекторат Републике Српске, Трг Републике Српске 8

² Природно-математички факултет, Универзитет у Бањој Луци, Младена Стојановића 2

³ Факултет за безбедност, Београд

Abstract

MILUNOVIĆ, I., Biljana LUBARDA, I. RADOVIĆ: ECOTOXICOLOGICAL EFFECTS OF DIESEL FUEL D₂ ON LUMBRICUS RUBELLUS SPECIES AND ITS APPLICATION IN BIOREMEDIATION PROCESSES [¹ Republic Administration for Inspection Activities, Republic of Srpska Inspectorate, Trg Republike Srpske 8, ² Faculty of Sciences, University of Banja Luka, Mladena Stojanovića 2, ³ Faculty of security studies, Belgrade]

The soil is a mealy surface fertile layer of lithosphere in which there is a volatile activity of pedologic flora and fauna. Toxic substances in the soil endanger the activities and survival of some representatives of the pedofauna. In this paper are given lethal concentrations of diesel fuel D₂ for species *Lumbricus rubellus*. Also, in this paper are demonstrated results of soil refinement influence of species *Lumbricus rubellus* and their influence to the process of bio remediation depending on the level of contaminants. Basic methodologies of this paper is in comprehension with principles of ISO 11268-1 standard.

Key words: *Lumbricus rubellus*, diesel fuel D₂, lethal concentrations, bioremediation

Сажетак

Земљиште представља растресит површински фертилни слој литосфере у коме се одвија бурна активност педолошке флоре и фауне. Загађујуће супстанце у земљишту угрожавају активности и опстанак неких представника педофауне. У овом раду су дате леталне концентрације дизел горива D₂ за врсту *Lumbricus rubellus*. У раду су такође приказани резултати утицаја врсте *Lumbricus rubellus* на пречишћавање земљишта и њиховог доприноса убрзању процеса биоремедијације у зависности од концентрације контаминанта. Основна методологија овог рада у складу је са принципима стандарда ISO 11268-1.

Кључне ријечи: *Lumbricus rubellus*, дизел D₂, летална доза, биоремедијација

УВОД

Контаминанти доспијевају у земљиште на разне начине те изазивају забринутост због загађења овог медија животне средине. Сирова нафта и њени деривати су једни од најчешћих контаминаната земљишта. Процјена је да у Европи данас постоји 350 000 контаминираних локација, од који је највећи број контаминиран дериватима сирове нафте (Troquet и сар, 2003).

Кишне глисте могу акумулирати нафту и њене деривате из земљишта у концентрацијама далеко вишим него у окружењу само уколико њихова концентарција није летална по живе организме.

Овај рад се бавио корелацијама између концентрација дизел горива D₂ и морталитета кишних глиста у различитим супстратима. Као тест организам кориштена је кишна глиста тачније врста *Lumbricus rubellus*, а супстрати: земљиште са локалитета „Рафинерија нафте“ Панчево (ПА-супстрат), Лумбрикохумус® (ЛХ-супстрат) и смјеса ова два супстрата у тежинском односу 1:1 (ПАЛХ-супстрат).

Познато је да се кишне глисте користе у процесима биоремедијације земљишта загађених нафтним дериватима. Анализе које су рађене у оквиру овог рада показују да

количина акумулираних петролејских угљоводоника у кишним глистама и није тако велика. Евидентно је да улога кишних глиста у биоремедијацији није директна (иако постоји), већ да је базирана на том да ствара повољније услове за дјеловање аеробних микроорганизама (главни разграђивачи петролејских угљоводоника).

Кишне глисте на два начина акумулирају токсине и то пасивном апсорпцијом кроз тјелесни омотач и активним путем уноса у цријева (Belfroid, 1994). Употребљавају се након ремедијацијске методе кад концентрација контаминаната опадне до одређене границе. Тада се опоравак земљишта врши биоремедијацијским методама. Биоремедијацијске технике су јефтиније него физичка и хемијска ремедијација и ефикаснија је при нижим концентрацијама контаминаната, мада процес деконтаминације може дуже трајати.

Рад приказује резултате чији је основни циљ да се утврди евентуални потенцијал биоремедијације земљишта контаминираног дизел горивом D₂, односно гранична концентрација контаминанта при којој долази до изражаја убрзање биоремедијације дјеловањем врсте *Lumbricus rubellus*.

МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

Стандардни тестови (ISO 11268-1, ISO 11268-2) су били основа за извођење овог рада, а разлика између експеримената проведених у овом раду и стандардног теста је избор врсте, избор супстрата и дужина трајања појединих експеримената. Као контаминант за супстрат кориштено је дизел гориво D₂ Рафинерије нафте Панчево. Биолошки материјал предвиђен за провођење експеримента набављен је на фарми „Инцел“ Бања Лука – Индустијске плантаже“. Тежина кишних глиста у експерименту износила је преко 300 mg. У извођењу експеримента коришћена су три типа супстрата :

1. Главни или основни супстрат- пречишћено земљиште са локације Рафинерија нафте Панчево (ПА)
2. Помоћни или контролни супстрат - Лумбрикохумус® (ЛХ)
3. Смјеса супстрата – мјешавина супстрата ПА и ЛХ у тежинском односу 1:1, прерачунато према садржају суве материје сваком од супстрата.

У свим типовима супстрата одређен је садржај укупних угљоводоника нафте (TPH-Total Petrol Hydrocarbons) (ISO 16703:2004, DIN EN 14345:2004) (Characterization of waste- Determination of hydrocarbons content by gravimetry), последије екстракције смјесом растварача ацетон/н-хептан (2:1 V/V), сушења екстракта анхидрованим натријум-сулфатом и пречишћавањем пропуштањем кроз колону са адсорбентом, како је то прописано стандардом ISO 16703:2004 (Soil quality-Determination of content of hydrocarbons in the range C₁₀ to C₄₀ by gas chromatography). Након тога урађена је рендгенска дифракциона анализа (Ђурић, 2002).

TPH у биомаси, урађен је из суве супстанце. Дубоко замрзнути материјал (око - 25°C) је одмржаван на собној температури, додатно сушен филтер хартијом и даље је одређен садржај воде, као и за супстрате. Добијена сува биомаса је даље екстрахована и сушена као супстрат. Због великог садржаја липида биомасе, који су екстраховани, адсорбент за пречишћавање је стуб Florisil®-а (Ђурић, 1973).

Да би се добила слика о саставу TPH и релативним односима, за сирове екстракте и TPH-екстракте урађена је гасна хроматографија.

Приликом извођења експеримента, у трајању од 14 до 28 дана, свакодневно су праћени температура ваздуха, влажност ваздуха, ваздушни притисак и температура земљишта.

РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА

У ПА супстрату констатован је 100% морталитет кишних глиста (Табела 1). Овакви резултати забиљежени су у свим пробама, а такође и у контролном узорку. Овако висок проценат морталитета није узрокован високим концентрацијама загађујуће материје него због фактора средине. Наиме, ПА-супстрату је током пречишћавања била потпуно поремећена земљишна структура, а садржај воде додаване приликом експеримента био је велики, тако да живот и одвијање основних физиолошких функција кишних глиста у оваком узорку је био онемогућен.

Табела 1. Резултати експеримента са ПА супстратом

Ознака паралелне пробе или слијепе пробе (контроле)	Номинална конц. mg D_2 250 CM	Биомаса <u>тежина глиста</u> број	Просјечна биомаса (mg)	Број уинулих глиста после 7 дана	Морталитет после 7 дана (%)
ПА-60 ppm	15	3,62g/10	362	10	100
ПА-180 ppm	45	3,84g/10	384	10	100
ПА-540 ppm	135	3,81g/10	381	10	100
ПА-1620 ppm	405	3,79g/10	379	10	100
ПА-4860 ppm	1215	3,90g/10	390	10	100
ПА-контрола-250 CM	0	3,72g/10	372	10	100
ПА- контрола -500 CM	0	3,69/10	369	10	100

Експериментални резултати са ЛХ-супстратом се разликују од претходних. Утврђено је да је проценат морталитета у корелацији са концентрацијом дизел горива D₂ (Табела 2). Најмања смртност (13,3%) забиљежена је у пробама гдје је концентрација износила 300 mg D₂/500 g суве масе земљишта. Највећи морталитет (93,3%) је забиљежен тек у оним пробама гдје је концентрација дизел горива D₂ износила 3000 ppm. Ово је важно због поступака биоремедијације, јер су досадашње анализе показале да врста *Eisenia foetida* показује велики морталитет и на много мањим концентрацијама нафтних деривата.

Табела 2. Резултати експеримента са ЛХ-супстратом

Ознака паралелне пробе или слијепе пробе	Номинална конц. mg D_2 500 CM	Биомаса <u>тежина глиста</u> број	Просјечна биомаса (mg)	Бр. уинулих глиста после 7 дана	Морталитет после 7 дана [%]	Бр. уинулих глиста после 14 дана	Морталитет после 14 дана [%]
ЛХ-1-600 ppm	300	3,25 g/10	325 mg	1	10%	1	10
ЛХ-2-600 ppm	300	3,43 g/10	343 mg	2	20% ⇒ 133%	2	20 ⇒ 13,3%
ЛХ-3-600 ppm	300	3,12 g/10	312 mg	1	10%	1	10
ЛХ-1-900 ppm	450	3,31 g/10	331 mg	2	20%	2	20
ЛХ-2-900 ppm	450	3,27 g/10	327 mg	2	20% ⇒ 20%	2	20 ⇒ 20%
ЛХ-3-900 ppm	450	3,11 g/10	311 mg	2	20%	2	20
ЛХ-1-1350 ppm	675	3,26 g/10	326 mg	4	40%	4	40
ЛХ-2-1350 ppm	675	3,28 g/10	328 mg	4	40% ⇒ 43,3%	4	40 ⇒ 43,3%
ЛХ-3-1350 ppm	675	3,34 g/10	334 mg	5	50%	5	50
ЛХ-1-2025 ppm	1012,5	3,07 g/10	307 mg	6	60%	6	60
ЛХ-2-2025 ppm	1012,5	3,24 g/10	324 mg	6	60% ⇒ 60%	6	60 ⇒ 60%

ЛХ-3-2025 ppm	1012,5	3,14 g/10	314 mg	6	60%	6	60
ЛХ-1-3000 ppm	1500	3,33 g/10	333 mg	9	90%	9	90
ЛХ-2-3000 ppm	1500	3,25 g/10	325 mg	10	100% ⇒ 93,3%	10	100 ⇒ 93,3%
ЛХ-3-3000 ppm	1500	3,28 g/10	328 mg	9	90%	9	90
ЛХ-1-kontrola	0	3,19 g/10	319 mg	0	0%	0	0
ЛХ-2-kontrola	0	3,36 g/10	336 mg	0	0% ⇒ 0%	0	0 ⇒ 0%
ЛХ-3-kontrola	0	3,27 g/10	327 mg	0	0%	0	0

Као трећи супстрат кориштена је мјешавина панчевачке земље и Лумбрикухумуса (ПАЛХ-супстрат).

Такође и у овом експерименту са повећањем концентрације повећава се морталитет кишних глиста (Табела 3). Морталитет од 26,6%, евидентиран је у пробама гдје концентрација дизел горива износила високих 3000 ppm. Значајно је истаћи да је у овом експерименту најмањи морталитет (13,3%) забиљежен у пробама гдје концентрација износила 1350 ppm.

Током серије експеримената којима је испитиван морталитет утврђено је да врста *Lumbricus rubellus*, након критичног периода од 7 дана, преживљава дужи временски период без обзира на врло високе концентрације дизел горива D₂.

Табела 3. Резултати експеримента са ПАЈХ супстратом

Ознака паралелне или слијепе пробе	Номинална конц. mg D ₂ 500 g SM	Биомаса шарже кишне глисте број (g)	Просијечна биомаса јединки (g)	Угинуће након 7 дана (број)	Морталитет (%)	Угинуће након 14 дана (број)	Морталитет (%)	Угинуће након 21 дана (број)	Морталитет (%)	Угинуће након 28 дана (број)	Морталитет (%)
ПАЈХ-1-600 ppm	300	3,63/10	363	0	0	0	0	0	0	0	0
ПАЈХ-2-600 ppm	300	3,76/10	376	0	0 ⇒ 0%	0	0 ⇒ 0%	0	0 ⇒ 0%	0	0 ⇒ 0%
ПАЈХ-3-600 ppm	300	3,72/10	372	0	0	0	0	0	0	0	0
ПАЈХ-1-900 ppm	450	3,52/10	352	0	0	0	0	0	0	0	0
ПАЈХ-2-900 ppm	450	3,68/10	368	0	0 ⇒ 0%	0	0 ⇒ 0%	0	0 ⇒ 0%	0	0 ⇒ 0%
ПАЈХ-900 ppm	450	3,72/10	372	0	0	0	0	0	0	0	0
ПАЈХ-1-1350 ppm	675	3,53/10	353	1	10	1	10	1	10	1	10
ПАЈХ-2-1350 ppm	675	3,71/10	371	2	20 ⇒ 13,3%	2	20 ⇒ 13,3%	2	20 ⇒ 13,3%	2	20 ⇒ 13,3%
ПАЈХ-3-1350 ppm	675	3,72/10	372	1	10	1	10	1	10	1	10
ПАЈХ-1-2025 ppm	1012,5	3,68/10	368	2	20	2	20	2	20	2	20
ПАЈХ-2-2025 ppm	1012,5	3,74/10	374	2	20 ⇒ 16,6%	2	20 ⇒ 16,6%	2	20 ⇒ 16,6%	2	20 ⇒ 16,6%
ПАЈХ-3-2025 ppm	1012,5	3,59/10	359	1	10	1	10	1	10	1	10
ПАЈХ-1-3000 ppm	1500	3,73/10	373	2	20	2	20	2	20	2	20
ПАЈХ-2-3000 ppm	1500	3,67/10	367	3	30 ⇒ 26,6%	3	30 ⇒ 26,6%	3	30 ⇒ 26,6%	3	30 ⇒ 26,6%
ПАЈХ-3-3000 ppm	1500	3,59/10	359	3	30	3	30	3	30	3	30
ПАЈХ -1-kontrola	0	3,79/10	379	0	0	0	0	0	0	0	0
ПАЈХ -2-kontrola	0	3,58/10	358	0	0 ⇒ 0%	0	0 ⇒ 0%	0	0 ⇒ 0%	0	0 ⇒ 0%
ПАЈХ -3-kontrola	0	3,78/10	378	0	0	0	0	0	0	0	0

Важан показатељ на основу кога се може разматрати потенцијал убрзања биоремедијације, а који је одређен кроз експеримент, је садржај ТРН. Концентрација ТРН одређена је у узорцима супстрата на почетку експеримента и након 28 дана (Табела 4).

Табела 4. Резултати убрзања биоремедијације

Ознака узорка (T ₀)	Аналитички садржај ТРН у узорку [mg/kg CM]	Ознака узорка (T ₂₈)	Аналитички садржај ТРН у узорку [mg/kg CM]	Разлика садржаја ТРН T ₂₈ – T ₀ (28 дана) [mg/kg CM]	Смањење садржаја ТРН (28 дана) [%]
T ₀ -ПАЛХ-контрола	124	T ₂₈ -PALH-kontrola	118	-6	-4,84
T ₀ -ПАЛХ-600ppm	733	T ₂₈ -PALH-600ppm	701	-32	-4,37
T ₀ -ПАЛХ-900ppm	1100	T ₂₈ -PALH-900ppm	1032	-68	-6,19
T ₀ -ПАЛХ-1350ppm	1465	T ₂₈ -PALH-1350ppm	1457	-8	-0,55
T ₀ -ПАЛХ-2025ppm	2157	T ₂₈ -PALH-2025ppm	2126	-31	-1,44
T ₀ -ПАЛХ-3000ppm	3116	T ₂₈ -PALH-3000ppm	3094	-22	-0,71

Анализа резултата садржаја ТРН показује да је биоремедијација била занемарљива. Међутим, детаљнијим увидом евидентно је да смањење садржаја ТРН процентуално расте до узорка T₀-ПАЛХ-900 ppm гдје је аналитички садржај ТРН на почетку експеримента 1100 mg/kg супстрата и да је процентуално највећа код истог узорка. Из литературе је познато да се најбољи биоремедијацијски резултати постижу код оптерећености земљишта нафтом од око 1000 mg/kg земљишта.

Приликом разматрања биоремедијације за овако релативно кратак временски период од 28 дана не треба очекивати спектакуларне резултате везано за брзину разградње ТРН. Ради се о почетном периоду биоремедијације гдје су доминантније квалитативне промјене, односно цијепање већих молекула угљоводоника на молекуле са мањим бројем угљеникових атома. Већи квантитативни помак у разградњи ТРН примјечује се после дужег временског периода од око 6 мјесеци.

На основу резултата може се закључити да је у релативно кратком временском периоду од 28 дана дошло до испољавања убрзања биоремедијације, највише код аналитичке концентрације од 1100 mg D₂/kg ПАЛХ-супстрата. Смањење ТРН концентрације за 6,19% после 28 дана никако није занемарљиво. За претпоставити је да би се после 6 мјесеци смањила за око 40%, што је значајан резултат.

Табела 5. Резултати анализе биолошког материјала (ПАЛХ-експеримент)

Ознака узорка биолошког материјала	Маса узорка [T ₂₈] (g)	Садржај влаге [T ₂₈] (%)	Маса узорка након сушења [T ₂₈] (g)	Садржај ⁽¹⁾ ТНР у узорку [T ₂₈] (mg/kg сувог узорка)	Маса ⁽²⁾ узорка [T ₀] (g)	Разлика маса узорка [T ₀ -T ₂₈] (g)	Губитак масе након 28 d. (%)	Влажност ⁽³⁾ супстрата после 28 d. (%)
T ₀ -БМ	3,3762	83,89	0,5440	1103	/	/	/	/
T ₂₈ -БМ(5)-600 ppm (T ₂₈ =ПАЛХ-БМ-600)	1,7255	81,12	0,3258	2455	1,8814	0,1559	8,29	41,67
T ₂₈ -БМ(5)-1350 ppm (T ₂₈ = ПАЛХ-БМ-1350)	1,3802	78,80	0,2926	2392	1,8553	0,4751	25,61	41,40
T ₂₈ -БМ(5)-2025 ppm (T ₂₈ = ПАЛХ-БМ-2025)	1,3621	79,95	0,2731	2497	1,8721	0,5100	27,24	41,77
T ₂₈ -БМ(5)-3000 ppm (T ₂₈ = ПАЛХ-БМ-3000)	1,1858	78,04	0,2604	3072	1,8352	0,6494	35,38	42,04
T ₂₈ -БМ(5)-kontrola (T ₂₈ = ПАЛХ-БМ-kont.)	1,8320	80,43	0,3585	1952	1,8923	0,0603	3,19	41,86

Смањење биомасе кишних глиста (Табела 5) је значајно почевши од трећег узорка, гдје је концентрација ТРН у супстрату 1350 ppm. Евидентно је да се са повећањем концентрације контамината у супстратима смањују масе кишних глисти што указује на смањену активност кишних глиста у пробама са већим концентрацијама контаминанта у супстратима. Такође је констатовано је да при вишим концентрацијама кишне глисте су обично груписане готово на једном мјесту у облику клупка, лоптице или кластера.

Садржај ТРН у узорцима биомасе показује очигледну корелацију између акумулације угљоводоника у кишним глистама и концентрације ТРН у супстратима. Из Табеле 6 се може видјети да садржај ТРН у узорцима биомасе расте са повећањем концентрације контаминанта у супстратима.

Табела 6. Почетне концентрације ТРН у супстратима и акумуловање ТРН у кишним глистама

Ознака узорка супстрата (T ₀)	Садржај ТРН у узорку супстрата [mg/kg CM]	Ознака узорка биолошког материјала (T ₂₈)	Садржај ТРН у узпрку ⁽¹⁾ [mg/mg сувог узорка] ^(a) [mg/mg влажног узорка] ^(b)	Прорачунати ⁽²⁾ садржај ТРН у 10 глиста након 28 дана (360 mg x 1 00) (mg)	Прорачунато смањење ⁽³⁾ ТРН у супс.. након 28 дана акумуловано у глистама (%)
T ₀ -ПАЛХ-600 ppm	733	T ₂₈ -ВМ(5)-600 ppm (T ₂₈ =PALH-ВМ-600) (%V=81,12%)	≈0,0024 ^(a) ≈0,0004 ^(b)	≈1,44 ^(b)	≈0,1964
T ₀ -ПАЛХ-1350 ppm	1465	T ₂₈ -ВМ(5)-1350 ppm (T ₂₈ =PALH-ВМ-1350) (%V=78,80%)	≈0,0023 ^(a) ≈0,0004 ^(b)	≈1,44 ^(b)	≈0,0982
T ₀ - ПАЛХ - 2025 ppm	2157	T ₂₈ -ВМ(5)-2025 ppm (T ₂₈ =PALH-ВМ-2025) (%V=79,95%)	≈0,0021 ^(a) ≈0,0004 ^(b)	≈1,44 ^(b)	≈0,0667
T ₀ - ПАЛХ - 3000 ppm	3116	T ₂₈ -ВМ(5)-3000 ppm (T ₂₈ =PALH-ВМ-3000) (%V=78,04%)	≈0,0030 ^(a) ≈0,0006 ^(b)	≈2,16 ^(b)	≈0,0006

Након 28 дана инкубације у већини влажних узорка биолошког материјала акумулирало се око 0,0004 mg ТРН, изузев у случају највеће контаминације од 3116 mg/kg, гдје је била око 0,0006 mg/mg влажног узорка биолошког материјала.

У случају када би се прорачуната вриједност акумулације од око 0,0004 mg/mg влажног узорка биолошког материјала, примјени на једну кишну глисту тежине 360 mg слиједи да би се у њој послје 28 дана инкубације акумуловало око 0,1440 mg ТРН дизел горива D₂ (односно у 10 јединки око 1,44 mg ТРН).

Резултати у Табели 6 потврђују да је главни пут контаминације петролејским угљоводоницима апсорпцијом кроз кожу. Дакле, и поред евидентне неактивности кишних глиста са повећањем концентрације, највиша акумулација ТРН је при највишој концентрацији дизел горива (3166 ppm). У овом узорку је примјећена највећа неактивност кишних глисти и највећи губитак у биомаси, а акумуловање ТРН у влажном узорку биомасе је у овом случају 0,0006 mg/mg влажног узорка.

Експеримент је потврдио постојање модалитета убрзања биоремедијације помоћу кишних глиста. С правом се може констатовати да је основна улога кишних глиста при биоремедијацији њихова активност, односно копање тунела и рупа у земљишту, чиме оне доприносе побољшању аерације земљишта и на тај начин стварају повољније услове за бржи развој и раст микроорганизама који разграђују петролејске угљоводонике. Такође, кретањем кроз земљиште у својим организмима заједно са земљиштем разносе микроорганизме и тиме доприносе њиховој бржој дистрибуцији у подручјима контаминираним нафтом или дериватима нафте.

ЗАКЉУЧАК

Током извођења експеримента одређен је проценат морталитета врсте *Lumbricus rubellus* кориштењем различитих концентрација дизел горива D₂. Највећи морталитет (100%) забиљежен је у експерименту са ПА-супстратом, али није узрокован концентрацијом контаминанта већ другим факторима.

Утврђена је корелација морталитета са концентрацијом дизел горива у супстратима ЛХ и ПАЛХ. Највећа стопа морталитета у ЛХ супстрату (93,3%) забиљежена тек у оним пробама гдје је концентрација дизел горива D₂ износила 3000 ppm а најмања (13,3%) у узорку са концентрацијом од 600 ppm.

Најмањи проценат морталитета у односу на концентрацију евидентиран је у ПАЛХ супстрату. Пошто се овдје радило о смјеси да различита типа супстрата (ПА и ЛХ) може се констатовати да би контаминирана земљишта прије провођења поступака биоремедијације вјероватно требало мјешати са другим „чистим“ земљиштем.

Биоремедијација као метода разградње контаминаната је јефтинија него физичка или хемијска ремедијација. Најбољи резултати се постижу при нижим концентрацијама контамината, у случају сирове нафте и средњих фракција деривата (дизел) обично при концентрацијама ТРН $\leq 1\text{g/kg CM}$, што је потврђено и у овом експерименту. Посебно велики допринос кишних глиста, у смислу убрзања процеса биоремедијације земљишта контаминованог угљоводонцима, је у томе што својом активношћу повећавају аерираност земљишта и убрзавају дистрибуцију микроорганизама.

Изузетно су активне када контаминација није превисока ($\leq 1\text{ g/kg CM}$ земљишта за нафту и дизел). Међутим, јединке кишних глиста врсте *Lumbricus rubellus* у супстратима при вишим концентрацијама (C3=1465 ppm) постају изузетно инактивне и смјештају се у дубину супстрата у облику клупка или неке врсте кластера.

Резултати овог рада, који се односе на морталитет, могу представљати основу за даље изучавање морталитета кишних глиста врсте *Lumbricus rubellus* у различитим типовима супстарата, као и могућност кориштења глиста за провођења поступака биоремедијације.

Такође резултати овога рада, који се односе на биоремедијацију, могу бити основа за даље изучавање процеса биоремедијације помоћу врсте *Lumbricus rubellus*. Битно је истаћи да се ради о врсти која је прилично покретљива и да у условима природних станишта може брзо пронаћи мјеста која су мање контаминирана петролејским угљоводонцима у односу на целокупну контаминирану површину.

ЛИТЕРАТУРА

1. Belfroid, A., M. Sikkenk, K. Van Gestel, W. Seinen, J. Hermens (1994): The toxicokinetic behavior of chlorobenzenes in earthworm (*Eisenia andrei*), experiments in soil. Environ. Toxicol.Chem. 13: 93-99.
2. Bossert, I.D., G.C. Compea (1995): Cleanup of petroleum hydrocarbon contamination in soil, in Young, L.Y. and Cerniglia, C.E. eds. Microbial Transformation and Degradation of Toxic Organic Chemicals, pp 77-125, Wiley-Liss. New York.
3. Đurić, S.B. (2005): Metode istraživanja u kristalografiji, Tehnički fakultet u Čačak i Institut tehničkih nauka. SANU, Čačak i Beograd.
4. Fitzgerald, D., K. A. Warner, R. P. Lanno and D. G. Dixon (1996): Assessing the effects of modifying factors on pentachlorophenol toxicity to earthworms: Applications of body residues. Environ. Toxicol. Chem. 15:2299-2304.
5. Gibbs, M.H., L.F. Wicker, A.J. Stewar (1996): A method for assessing sublethal effects of contaminants in soil to the earthworm, *Eisenia foetida* S. J. Agr. Food Chem. 15 (3): 360-368.

6. ISO 16703: Soil quality – Determination of content of hydrocarbons in range C₁₀ to C₄₀ by gas chromatography, 2004.
7. ISO 11268-1: Soil quality -- Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*) -- Part 1: Determination of acute toxicity using artificial soil substrate, 1993.
8. ISO 11268-2: Soil quality -- Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*) -- Part 2: Determination of effects on reproduction, 1998.
9. Troquet, H.N., C. Larroche, C.G. Ussap (2003): Evidence for the occurrence of an oxygen limitation during soil bio-remediation by solid state fermentation. *Biochemical Engineering J.* 13. 103-112.
10. Lavelle, P. (1988): Earthworm activities in the soil system. *Biol. Fertil. Soil.* 6: 237-251.
11. Milicic-Terzic, J., Y. Lopez-Vidal, M.M. Vrvic, S. Saval (2001): Detection of catabolic genes in indigenous microbial consortia isolated from a diesel-contaminated soil.
12. OECD (1984): 'Earthworm, acute toxicity tests', OECD Guideline for Testing of Chemicals, OECD, Paris, 1-9.
13. Salanitro, J.P. (1997): Crude oil hydrocarbons bioremediation and soil ecotoxicity assessment. *Environmental Science and Technology* 31(6):1769-1776.

Примљено: 30.01.2012.

Одобрено: 27.06.2012.