

# КИШНЕ ГЛИСТЕ КАО ТЕСТ ОРАГНИЗМИ ЗА ЕКОТОКСИКОЛОШКО ПРОЦЈЕЊИВАЊЕ ЗЕМЉИШТА КОНТАМИНИРАНОГ ПЕСТИЦИДИМА

Милуновић Игор<sup>1</sup>, Лубарда Биљана<sup>2</sup>, Тркуља Војислав<sup>3</sup>, Радовић Ивица<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Републичка управа за инспекцијске послове, Инспекторат Републике Српске

<sup>2</sup> Природно-математички факултет, Универзитет у Бањој Луци

<sup>3</sup> Пољопривредни институт Бања Лука, Књаза Милоша 17, Бања Лука

<sup>4</sup> Факултет за безбедност, Београд

## Abstract

**MILUNOVIĆ, I., BILJANA LUBARDA, V. TRKULJA, I. RADOVIĆ: EARTHWORMS AS TEST ORGANISMS FOR ECOTOXICOLOGICAL EVALUATION OF PESTICIDES CONTAMINATED SOIL** [<sup>1</sup>Republic Administration for Inspection Activities, Republic of Srpska Inspectorate, <sup>2</sup>Faculty of Science, University of Banja Luka, <sup>3</sup>The agricultural institute of Republic of Srpska, Banja Luka Knjaza Miloša 17 <sup>4</sup> Faculty of security studies, Belgrade]

Earthworms can be a reliable indicator of toxic and subtoxic concentrations presence of heavy metals as well as pesticides, raw oil and oil derivatives in soil. They are often used as organisms efficient for performance of ecotoxicological tests, first of all due to their noticeable reaction related to a change of diverse parameters of their habitat, as well as their functional significance of being a decomposer, their significant role in soil aeration that allows the increase in the aerobic microorganisms' activity and their relatively great biomass in soil. In the experimental part of the work, there will be used the various substrate types which will be contaminated with exactly determined concentrations of herbicides Stomp 330- E and Radazin T-50. Whole methodology has been made under the principles of ISO 17512-1 and ISO 11268-2 standards.

**Key words:** earthworms, soil, pesticides, avoidance test.

## Сажетак

Кишне глисте могу бити поуздан индикатор присуства токсичних и субтоксичних концентрација тешких метала, пестицида, сирове нафте и нафтних деривата у земљишту. Праг осјетљивости кишних глиста на дјеловање токсичних материја нижи је од већине биљака и животиња па се може рећи да оне представљају једну врсту аларма који упозорава на загађеност земљишта. У раду су приказани резултати теста избјегавања двије врсте кишних глиста (*Lumbricus terrestris* и *Lumbricus rubellus*) земљишта контаминираног пестицидима STOMP 330 – E и Radazin T-50. Цјелокупна методологија урађена је по принципима стандарда ISO 17512 - 1 и ISO 11268 -2.

**Кључне ријечи:** кишне глисте, земљиште, пестициди, тест избјегавања.

## УВОД

Кишне глисте се често употребљавају као тест организми у екотоксикологији земљишта. Важни индикатори стандардних екотоксиколошких тестова показују директне ефекте као што су смртност, размножавање и сл., док се тестови понашања фокусирају на индиректне ефекте. Смањење популације због морталитета или смањење репродукције су еколошке послједице изложености хемикалијама у земљишту.

Промјена понашања приликом избјегавања супстрата је такође еколошки релевантна величина, што се доказује између осталог и тим да су тестови

избјегавања контаминираних земљишта стандардизовани стандардом ISO 17512-1.

Познато је да миграције глиста и самим тим губитак њихових корисних функција у земљишту (аерација, дренажа, обогаћење органским материјама итд.) доводе до деградације тла. Исто тако, губитак глиста са површине може утицати на број предатора. Због свега тога, миграције глиста имају утицај на екосистем. Из тог разлога тестови понашања су уврштени у стандардне екотоксиколошке тестове да би се могао процјенити токсични утицај хемикалија на екосистем земљишта.

Њихова специфична грађа која има за последицу изузетну осјетљивост на хемикалије, заједно са њиховом покретљивошћу, омогућава кишним глистама да избјегавају неповољна станишта. Тест избјегавања рефлектује способности понашања кишних глиста. Принцип тестова избјегавања је склоност или избјегавање супстрата након одређеног периода изложености.

Контаминанти су препарати Stomp 330-E, са активном материјом пендиметалин и Radazin T 50, са активном материјом атразин, који се користе као селективни хербициди за сузбијање корова у усјевима многих ратарских и повртларских биљака.

## МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

Методолошка основа за извођење овог рада је методологија стандардног теста ISO 17512-1. Разлика између експеримената проведених у овом раду и стандардног теста је избор врсте кишних глиста као и избор контаминанта.

Као тест организми (биолошки материјал) кориштене су врсте *Lumbricus rubellus* и *Lumbricus terrestris* (Oligochaeta, Annelida), просјечне тежине преко 300 mg које су прије увођења у експеримент испиране водом и сушене на увијајућем папиру 24 сата како би испразиле садржај цријева. Свака кишна глиста је била извагана прије увођења у тест контејнере.

Супстрат кориштен у овом раду је припремљен према супстрату из стандарда ISO 17512-1. Ради се о вјештачком супстрату који се састоји од кварцног пијеска (веома мале гранулације) у проценту од 70%, глине која садржи око 30% каолина, у проценту од 20% и тресета у проценту од 10%. Влажност супстрата је подешавана на 60%, а рН на 5.

Тестни контејнери су израђени од стакла и димензија су 20 x 20x 10 cm. Напуњени су супстратом до висине од око 7 cm, што је износило 1500 грама на половину контејнера, односно три килограма по контејнеру. Један дио тестне посуде је испуњен незагађеним референтним супстратом и одвојен стакленом преградом од загађеног тестног супстрата. Послије уклањања преграде на централну линију на површину земљишта ставља се десет глиста у сваки тест контејнер. Након што су глисте ушле у земљиште (t 0) посуде су затворене прозирном фолијом која је омогућавала довољну прозаченост. Између два супстрата је била омогућена несметана миграција. Инкубација траје 48 сати (t 48) и након тога два супстрата унутар тестне јединице су одвајају преградом и кишне глисте у сваком тестном супстрату су послане, пребројане и забиљежене.

За контаминацију супстрата кориштени су пестициди Stomp 330-E, са активном материјом пендиметалин и Radazin T 50, са активном материјом атразин.

Приликом извођења експеримента, свакодневно су праћени: температура ваздуха, влажност ваздуха, ваздушни притисак и температура земљишта.

## РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА

У току извођења цјелокупног експеримента рађена су два теста. Први тест избјегавања означен је као Прелиминарни тест избјегавања, а други тест Главни тест избјегавања.

Улога Прелиминарног тест јесте одређивање прецизних концентрација које су употребљене у Главном тесту избјегавања. Основа за одређивање концентрација је препоручена концентрација произвођача хербицида и LC<sub>50</sub> за глисте (Јањић и Митић, 2004.). За сваку врсту пестицида као и за сваку врсту глиста је одређено пет концентрација и за сваку концентрацију су рађене по три реплике.

Резултати Прелиминарног теста послужили су за одређивање EC20, ефективне концентрације која је карактеристична за контаминирано земљиште када је избјегавање 80% од укупног броја присутних јединки. Према стандарду ISO 17512-1 свако тестно земљиште које има број глиста мањи од 20% од укупног броја, сматра се да има ограничену станишну функцију. Анализом добијених резултата можемо констатовати да обе врсте избјегавају пестициде прилично очекивано. Боље речено, са повећањем концентрације и једног и другог контаминанта избјегавање је веће (рачунато као просјек глиста у 3 реплике исте концентрације).

Забилежено је да постоји и одређена разлика у односу којим пестицидом је контаминиран супстрат. Наиме, код Radazina T 50, са активном материјом атразин, и једна и друга врста глиста понашају се тако да избјегавање настаје већ од треће (растуће) концентрације, док код препарата Stomp 330-E, са активном материјом пендиметалин избјегавање је евидентирано у четвртој и петој концентрацији.

Одређене су и ефективне концентрације EC20 које износе:

- *Lumbricus rubellus* у супстрату контаминаном препаратом Radazin T 50-63µl/kg,
- *Lumbricus terrestris* у супстрату контаминаном препаратом Radazin T 50-78µl/kg,
- *Lumbricus rubellus* у супстрату контаминаном препаратом Stomp 330-E-57,11µl/kg и
- *Lumbricus terrestris* у супстрату контаминаном препаратом Stomp 330-E-53,87µl/kg

**Табела 1.** Резултати Прелиминарног теста избјегавања за врсту *Lumbricus rubellus* и *Lumbricus terrestris* у супстрату контаминаном препаратом Radazin T 50 (атразин)

Р. бр.	Ознака контејнера	Број гл. у конт. супстрату (X)	Број гл. у неконт. супстрату (K)	Просјек X/K	Однос X/K (процент)	Ознака контејнера	Број гл. у конт. супстрату (X)	Број гл. у неконт. супстрату (K)	Просјек X/K	Однос X/K (процент)	Концентрација хербицида (препарата)
1.	A/1/I-LR	7	3	3/7	63,30%	A/1/I-LT	5	5	5/5	36,6%	2,0 µl/kg(66,6% prep)
2.	A/1/II-LR	4	6			A/1/II-LT	3	7			2,0 µl/kg(66,6% prep)
3.	A/1/III-LR	8	2			A/1/III-LT	7	3			2,0 µl/kg(66,6% prep)
4.	A/2/I-LR	2	8	4/6	40%	A/2/I-LT	4	6	3/7	30%	3,0µl/kg(100% prep)
5.	A/2/II-LR	6	4			A/2/II-LT	2	8			3,0µl/kg(100% prep)
6.	A/2/III-LR	4	6			A/2/III-LT	3	7			3,0µl/kg(100% prep)
7.	A/3/I-LR	1	9	1,66/8,33	16,6%	A/3/I-LT	3	7	2/8	20%	52µl/kg(33,3%LC50)
8.	A/3/II-LR	1	9			A/3/II-LT	1	9			52µl/kg(33,3%LC50)
9.	A/3/III-LR	3	7			A/3/III-LT	2	8			52µl/kg(33,3%LC50)
10.	A/4/I-LR	1	9	1/9	10%	A/4/I-LT	1	9	1,66/ ,33	16,6%	104µl/kg(66,6%LC50)
11.	A/4/II-LR	2	8			A/4/II-LT	4	6			104µl/kg(66,6%LC50)
12.	A/4/III-LR	0	10			A/4/III-LT	0	10			104µl/kg(66,6%LC50)
13.	A/5/I-LR	1	9	0,66/9,33	6,60%	A/5/I-LT	2	8	1,66/8,33	16,6%	156µl/kg(100%LC50)
14.	A/5/II-LR	0	10			A/5/II-LT	2	8			156µl/kg(100%LC50)
15.	A/5/III-LR	1	9			A/5/III-LT	1	9			156µl/kg(100%LC50)

**Табела 2.** Резултати Прелиминарног теста избјегавања за врсту *Lumbricus terrestris* и *Lumbricus rubellus* у супстрату контаминованим препаратом Stomp 330-Е (пендиметалин)

Р. бр.	Ознака контејнера	Број гл. у конт. супстрату (X)	Број гл. у неконт. супстрату (K)	Просјек X/K	Однос X/K (процент)	Ознака контејнера	Број гл. у конт. супстрату (X)	Број гл. у неконт. супстрату (K)	Просјек X/K	Однос X/K (процент)	Концентрација хербицида (препарата)
1.	P/1/I-LR	7	3	5,33/4,66	53,30%	P/1/I-LT	9	1	7,6/2,8	76,60%	3,3µl/kg(66,6% prepor)
2.	P/1/II-LR	6	4			P/1/II-LT	8	2			3,3µl/kg(66,6% prepor)
3.	P/1/III-LR	3	7			P/1/III-LT	5	5			3,3µl/kg(66,6% prepor)
4.	P/2/I-LR	5	5	5/5	50%	P/2/I-LT	4	6	3,66/6,33	36,60%	5 µl /kg(100% prepor)
5.	P/2/II-LR	5	5			P/2/II-LT	1	9			5µl/kg(100% prepor)
6.	P/2/III-LR	5	5			P/2/III-LT	6	3			5µl/kg(100% prepor)
7.	P/3/I-LR	4	6	3,33/6,66	33,30%	P/3/I-LT	4	6	3/7	30%	22,28µl/kg(33,3%LC50)
8.	P/3/II-LR	3	7			P/3/II-LT	1	9			22,28µl/kg(33,3%LC50)
9.	P/3/III-LR	3	7			P/3/III-LT	4	6			22,28µl/kg(33,3%LC50)
10.	P/4/I-LR	0	10	01.sep	10%	P/4/I-LT	1	9	1,33/8,66	13,30%	45,73µl/kg(66,6%LC50)
11.	P/4/II-LR	0	10			P/4/II-LT	2	8			45,73µl/kg(66,6%LC50)
12.	P/4/III-LR	3	7			P/4/III-LT	1	9			45,73µl/kg(66,6%LC50)
13.	P/5/I-LR	0	10	0/10	0%	P/5/I-LT	0	10	0/10	0%	68,4µl/kg(100%LC50)
14.	P/5/II-LR	0	10			P/5/II-LT	0	10			68,4µl/kg(100%LC50)
15.	P/5/III-LR	0	10			P/5/III-LT	0	10			68,4µl/kg(100%LC50)

У Главном тесту избјегавања кориштене су 2 врсте глиста (*Lumbricus terrestris* и *Lumbricus rubellus*), 2 врсте пестицида (атразин, пендимезалин) у 5 различитих концентрација и 3 идентичне реплике. Током извођења Главног теста избјегавања придржавало се свјетлосног режима у природи, а мјерена је свакодневно температура ваздуха и температура земљишног супстрата. Влажност је била подешена на 60%, а рН на 5.

Анализом добијених резултата Главног теста можемо констатовати да обе врсте избјегавају пестициде прилично очекивано, као што је случај и са претходно урађеним тестом. У дијелу експеримента који је рађен за врсту *Lumbricus rubellus* у супстрату контаминираним препаратом Radazin Т 50 (атразин), се може констатовати да је концентрација од 63 µl/kg стварна граница избјегавања (Табела 3). Слично се понаша врста *Lumbricus terrestris* у супстрату контаминираним препаратом Radazin Т 50 (атразин). Наиме, избјегавање је евидентно у свим концентрацијама преко одређене ЕС20 (78µl/kg), иако се може уочити да је веће избјегавање у четвртој него у петој концентрацији. Међутим, то не представља неки посебан проблем, јер су обе концентрације изнад граничне концентрације, дапаче доказује да се често у експерименталним радовима, а посебно када су у питању живи организми, не може се очекивати 100%-тна усклађеност са теоретским предвиђањима. Слично се дешава и са врстом *Lumbricus terrestris* у супстрату контаминираним препаратом Stomp 330-Е (пендиметалин) гдје су посљедње двије концентрације "пермутирале" мјеста. Концентрација избјегавања ЕС20 је 57,11µl/kg. Код врсте *Lumbricus rubellus* у супстрату контаминираним препаратом Stomp 330-Е (пендиметалин) имамо идентичан проценат избјегавања у четвртој и петој концентрацији, али су обе концентрације такође изнад критичне концентрације - ЕС20 која износи 53,87µl/kg (Табела 4).

Оно што још са сигурношћу можемо констатовати је да препоручене концентрације произвођача не утичу на понашање кишних глиста у смислу избјегавања.

Јако је важно истаћи да земљишта која су контаминирана са концентрацијама пестицида већим, од у раду евидентираних избјегавајућих концентрација (ЕС20), сматрају се да имају ограничену станишну функцију.

**Табела 3.** Резултати Главног теста избјегавања за врсту *Lumbricus rubellus* и *Lumbricus terrestris* у супстрату контаминованом препаратом Radazin T 50 (атразин)

Р. бр.	Ознака контејнера	Број гл. у конт. супстрату (X)	Број гл. у неконт. супстрату (К)	Просјек X/К	Однос X/К (процент)	Ознака контејнера	Број гл. у конт. супстрату (X)	Број гл. у неконт. супстрату (К)	Просјек X/К	Однос X/К (процент)	Концентрација хербицида (препарата)
1.	A/1/I-LR	6	4	4,6/6,4	46%	A/1/I-LT	4	6	4,66/5.33	46%	31,5 µl/kg(50% EC20)
2.	A/1/II-LR	4	6			A/1/II-LT	4	6			31,5 µl/kg(50% EC20)
3.	A/1/III-LR	4	6			A/1/III-LT	6	4			31,5 µl/kg(50% EC20)
4.	A/2/I-LR	2	8	2,33/7,66	23%	A/2/I-LT	2	8	3/7	30%	47,25µl/kg(75% EC20)
5.	A/2/II-LR	2	8			A/2/II-LT	4	6			47,25µl/kg(75% EC20)
6.	A/2/III-LR	3	7			A/2/III-LT	3	7			47,25µl/kg(75% EC20)
7.	A/3/I-LR	2	8	2/8	20%	A/3/I-LT	2	8	0,83/9,16	8,30%	63µl/kg(100% EC20)
8.	A/3/II-LR	1	9			A/3/II-LT	1	9			63µl/kg(100% EC20)
9.	A/3/III-LR	3	7			A/3/III-LT	2	8			63µl/kg(100% EC20)
10.	A/4/I-LR	2	8	0,33/9,76	3,30%	A/4/I-LT	0	10	1/9	10%	94,5µl/kg(150%EC20)
11.	A/4/II-LR	0	10			A/4/II-LT	0	10			94,5µl/kg(150%EC20)
12.	A/4/III-LR	0	10			A/4/III-LT	3	7			94,5µl/kg(150%EC20)
13.	A/5/I-LR	1	9	0,16/9,83	1,60%	A/5/I-LT	0	10	0,33/9,66	3,30%	126µl/kg(200%EC20)
14.	A/5/II-LR	0	10			A/5/II-LT	1	9			126µl/kg(200%EC20)
15.	A/5/III-LR	0	10			A/5/III-LT	0	10			126µl/kg(200%EC20)

**Табела 4.** Резултати Главног теста избјегавања за врсту *Lumbricus terrestris* и *Lumbricus rubellus* у супстрату контаминованом препаратом Stomp 330-E (пендиметалин)

Р. бр.	Ознака контејнера	Број гл. у конт. супстрату (X)	Број гл. у неконт. супстрату (K)	Просјек X/K	Однос X/K (процент)	Ознака контејнера	Број гл. у конт. супстрату (X)	Број гл. у неконт. супстрату (K)	Просјек X/K	Однос X/K (процент)	Концентрација хербицида (препарата)
1.	P/1/I-LR	3	7	2,66/7,33	26%	P/1/I-LT	3	7	4/6	40%	25,68µl/kg(80% EC20)
2.	P/1/II-LR	3	7			P/1/II-LT	5	5			25,68 µl/kg(80% EC20)
3.	P/1/III-LR	2	8			P/1/III-LT	3	7			25,68 µl/kg(80% EC20)
4.	P/2/I-LR	3	7	2,33/7,66	23%	P/2/I-LT	2	8	2,33/7,66	23%	51,40µl/kg(90% EC20)
5.	P/2/II-LR	2	8			P/2/II-LT	4	6			51,40µl/kg(90% EC20)
6.	P/2/III-LR	2	8			P/2/III-LT	1	9			51,40µl/kg(90% EC20)
7.	P/3/I-LR	2	8	1,66/8,33	<b>16,60%</b>	P/3/I-LT	2	8	0,66/9,33	<b>6,60%</b>	57,11µl/kg(100% EC20)
8.	P/3/II-LR	2	8			P/3/II-LT	1	9			57,11µl/kg(100% EC20)
9.	P/3/III-LR	1	9			P/3/III-LT	1	9			57,11µl/kg(100% EC20)
10.	P/4/I-LR	2	8	1,66/8,33	<b>16,60%</b>	P/4/I-LT	0	10	0,33/9,66	<b>3,30%</b>	62,82µl/kg(110%EC20)
11.	P/4/II-LR	3	7			P/4/II-LT	1	9			62,82µl/kg(110%EC20)
12.	P/4/III-LR	0	10			P/4/III-LT	0	10			62,82µl/kg(110%EC20)
13.	P/5/I-LR	1	9	0,33/9,66	<b>3,30%</b>	P/5/I-LT	0	10	01.sep	<b>10%</b>	68,53µl/kg(120%EC20)
14.	P/5/II-LR	0	10			P/5/II-LT	1	9			68,53µl/kg(120%EC20)
15.	P/5/III-LR	0	10			P/5/III-LT	2	8			68,53µl/kg(120%EC20)



## ЗАКЉУЧАК

На основу добијених резултата може констатовати да су током извођења Прелиминарног теста избјегавања одређене ефективне концентрације (EC20) пестицида, којима су контаминовани супстрати, при којима кишне глисте се понашају тако да избјегавају земљишта, а оне износе:

- *Lumbricus rubellus* у супстрату контаминованом препаратом Radazin T 50- 63 $\mu$ l/kg,
- *Lumbricus terrestris* у супстрату контаминованом препаратом Radazin T 50- 78 $\mu$ l/kg,
- *Lumbricus rubellus* у супстрату контаминованом препаратом Stomp 330-E-57, 11 $\mu$ l/kg и
- *Lumbricus terrestris* у супстрату контаминованом препаратом Stomp 330-E-53, 87 $\mu$ l/kg

Анализом добијених резултата Главног теста можемо констатовати да обе врсте избјегавају пестициде прилично очекивано, као што је случај и са претходно урађеним тестом.

Оно што још са сигурношћу можемо констатовати је да препоручене концентрације произвођача не утичу на понашање кишних глиста у смислу избјегавања.

Наведена истраживања имају велики значај у примјени из разлога што могу бити коришћени за брзу евалуацију станишне функције земљишта. То може бити велика предност са аспекта заштите животне средине у смислу што кишне глисте врсте *Lumbricus terrestris* и врсте *Lumbricus rubellus* су организми који се већ налазе у земљишту, као и са аспекта уштеде времена јер се ови резултати добију након 48 сати, за разлику од акутних тестова (14 дана) као и тестова репродукције (56 дана). Сасвим је очито да бихејвиоризам ових врста кишних глиста може бити поуздан детектор загађености пољопривредних земљишта.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Dorn, P.B., J. P. Salanitro (2000): Temporel ecological assessment of oil contaminated soils before and after bioremediation; *Chemosphere* 40; pp. 419-426.
2. Dunger, W., H.J Fiedler (1989): *Methoden der Bodenbiologie*. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York.
3. Edwards, C.A., P.J. Bohlen (1996): *Biology and Ecology of Earthworms*, Chapman & Hall Ltd. London, New York.
4. International Standard ISO 11268-1: Soil quality – Effects of pollutants on earthworms – Part 1: Determination of acute toxicity using artificial soil substrate. International Organization for Standardization, Genf. 1993.
5. Jablanović, M., P. Jakšić, K. Kosanović (2003): *UVOD U EKOTOKSIKOLOGIJU*. Univerzitet u Prištini, Prirodno-matematički fakultet, Kosovska Mitrovica.
6. Јањић, В., С. Митић (2004): *Пестициди у пољопривреди и шумарству*. Пољопривредни факултет, Бања Лука.
6. Krunić, M. (1995): *ZOOLOGIJA INVERTEBRATA*, II deo. Zavod za udžbenike i nastavna sredstva. Beograd.
7. Metoničkin, I. (1970): *Zoologija invertebrata*, II izdanje, Zagreb.
8. Schaefer, M. (2001) : Earthworms in crude oil contaminated soils: Toxicity tests and effects on crude oil degradation. *Soil Sediment Water*, pp. 35-37.
9. Schaefer, M. (2003): Behavioural endpoints in earthworm ecotoxicology: Evaluation of different test systems in soil toxicity assessment. *J. Soil. Sediment*, pp.79-84.
10. Stephenson, G. L., A. Kaushik, N. K. Kaushik, K. R. Solomon, T. Steele, R. P. Scroggins: Use of an avoidance-response test to assess the toxicity of contaminated soil to earthworms.

11. Sheppard, S.C., J. D. Bembridge, M. Holmstrup, L. Posthuma (1998):  
*Advances in earthworm ecotoxicology*, pp 67-81. SETAC Press, Pensacola, FL.
12. Stephenson, G.L. (2003): Terrestrial test methods for plants and soil invertebrates.  
PhD. Thesis, Department of Environmental Biology, University of Guelph, Guelph,  
230 p.

Примљено: 30.01.2012.

Одобрено: 27. 06. 2012.