

Jerzy Dziejowski, Ewa Ropelewska

ZMIANY AKTYWNOŚCI METABOLICZNEJ GLEBY WYWOŁANE OBECNOŚCIĄ DŹDŻOWNIC GATUNKU *LUMBRICUS TERRESTRIS* L. – TEST MIKROKALORYMETRYCZNY

Streszczenie. W pracy przedstawiono wyniki badań wpływu aktywności dżdżownic w glebie na proces biodegradacji glukozy. Opracowano test mikrokalorymetryczny pozwalający na wyznaczenie kinetycznych parametrów badanych procesów w glebie. Przeprowadzono analizę zmian szybkości wydzielania ciepła i wyznaczono całkowite efekty cieplne. Wyniki potwierdziły zmianę kinetyki procesu rozkładu glukozy w glebie, będącej środowiskiem bytowania dżdżownic, w porównaniu z glebą kontrolną.

Słowa kluczowe: kalorymetria izotermiczna, dżdżownice, gleba, aktywność mikrobiologiczna.

WSTĘP

Gleba jest naturalnym środowiskiem wzrostu, rozwoju i reprodukcji dżdżownic. Pożywieniem preferowanym przez te organizmy są głównie liście oraz inne szczątki roślinne [Richter 2010]. Dżdżownice mogą występować w różnych siedliskach łądowych [Butenschoen i in. 2009, Rätty 2004]. Rozwój dżdżownic może być ograniczony przez pestycydy występujące w podłożu (Kostecka 1999a, Kostecka 1999b). W warunkach laboratoryjnych wykazano trudności w chowie tych organizmów [Kostecka, Durak 1997].

Dżdżownice wykorzystuje się do produkcji wermikompostów o wysokiej wartości nawozowej [Kostecka, Durak 1997]. Mogą być używane do wermikompostowania oborników (końskiego, bydłęcego), osadów ściekowych, odpadów komunalnych, odpadów pochodzących z gospodarstw rolnych, odpadów kuchennych. Dżdżownice unieszkodliwiają te substancje i przetwarzają je na wermikompost [Kostecka 2000].

Aktywność dżdżownic wpływa na strukturę gleby, stan jej natlenienia oraz skład chemiczny agregatów glebowych. Makropory drążone przez dżdżownice mogą mieć różne kształty, najczęściej wertykalne, prowadzące z głębi profilu glebowego do powierzchni gleby [Richter 2010]. Otwory mogą być wypełnione wydzieliną będącą produktem metabolizmu dżdżownic, a ich ściany wzbogacone o materię organiczną [Piron i in. 2012]. Kolejnym efektem wywołanym przez te organizmy są procesy biodegradacji substancji organicznych w glebie. Powoduje to zmiany w środowisku mikrobiologicznym i prowadzi do wzrostu aktywności metabolicznej gleby [Bhadauria, Saxena 2010, Laossi i in. 2010].

Dżdżownice powodują rozkład substancji organicznych w sposób bezpośredni lub pośredni. W przypadku sposobu bezpośredniego dżdżownice wykorzystują różne substancje organiczne jako pokarm i wydzielają odchody. Pośredni proces rozkładu polega na wykorzystaniu przez drobnoustroje glebowe udostępnionych przez dżdżownice substratów odżywczych [Ceccanti i in. 2006].

W dostępnej literaturze znaleziono niewiele danych na temat mikrokalorymetrycznych badań dotyczących wpływu wermikompostów i innych podobnych preparatów na aktywność mikrobiologiczną gleby [Crittter i in. 2004, Sigstad i in. 2002].

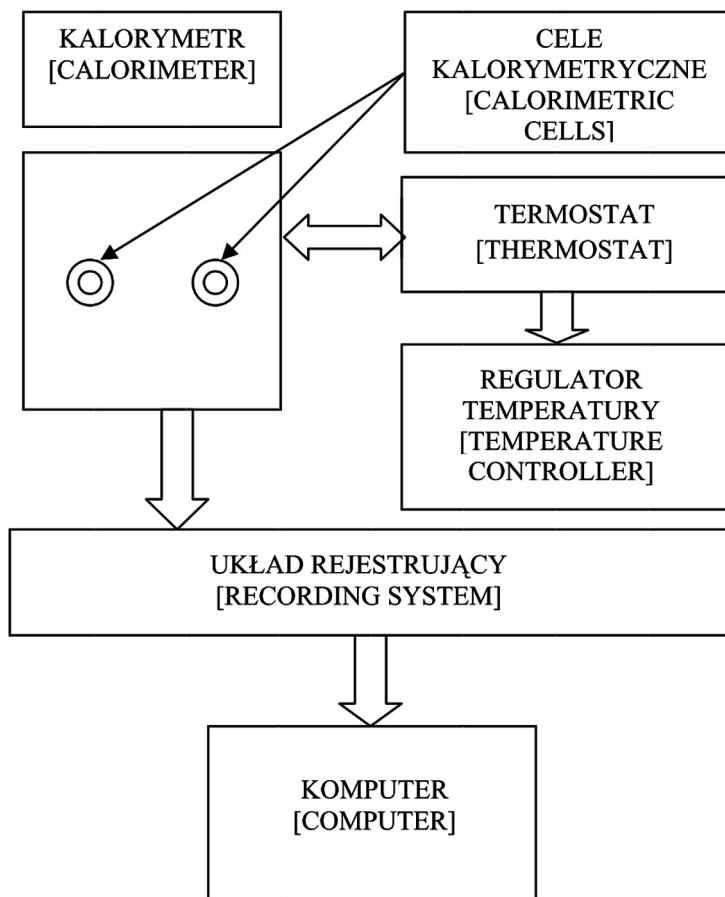
Celem badań było opracowanie mikrokalorymetrycznego testu pozwalającego na stwierdzenie zmian aktywności metabolicznej gleby wywołanych obecnością dżdżownic.

MATERIAŁ I METODY

Do doświadczeń użyto glebę brunatną pobraną w Stacji Doświadczalnej Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Tomaszku k/Olsztyna. Glebę z warstwy powierzchniowej (0-20 cm) przechowywano w temperaturze pokojowej (293-295 K) do uzyskania powietrznie suchej masy. Po przesianiu przez sito o otworach $2 \times 2 \text{ mm}^2$, glebę przechowywano w temperaturze 277 K. Badana gleba charakteryzowała się następującymi właściwościami fizyko-chemicznymi: $\text{pH-H}_2\text{O}$: 5.61; pH-1 M KCl : 4.55; C_{org} : 2.02 %; N_{tot} : 0.123 %; kwasowość hydrolityczna: $3.92 \text{ me} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$; kwasowość wymienna: $14.60 \text{ me} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$; K^+ : $29.00 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$; Na^+ : $85.00 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$; Ca^{2+} : $2.00 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$; Mg^{2+} : $11.00 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$.

Dżdżownice *Lumbricus terrestris* pobrano z warstwy gleby wykorzystywanej pod uprawę warzyw w ogródku przydomowym. Gatunek oznaczano na podstawie klucza do oznaczania skąposzczetów glebowych z rodziny: dżdżownice (*Lumbricidae*) [Kasprzak 1986]. Do identyfikacji gatunku *Lumbricus terrestris* posłużyły między innymi następujące cechy: siodełko obejmujące segmenty XXXI, XXXII-XXXVII; dobrze widoczne otwory płciowe męskie; cylindryczne ciało z silnie spłaszczonym tylnym końcem; ciemna grzbietowa strona ciała z wyraźną smugą środkową w rejonie pozasiodełkowym; jasnobieżowa strona brzuszna z odcieniem różowym; pomarańczowe siodełko; widoczne nabrzemia gruczołowe wokół otworów płciowych męskich [Kasprzak 1986]. Glebę i dżdżownice przechowywano w polietylenowych naczyniach o objętości 100 cm^3 , zamkniętych pokrywkami z otworami o średnicy około 1 mm, zapewniającymi wymianę powietrza. Testowane próby gleby o masie 100 g zawierały 5 dżdżownic o masie pojedynczego osobnika około 1 g.

Do badań użyto prototypowy układ kalorymetryczny (rys. 1) złożony z kalorymetru izotermicznego, termostatu, regulatora temperatury, układu rejestracji danych i komputera. Kalorymetr zawierał dwie cele: pomiarową i odniesienia o budowie przedstawionej na rys. 2.



Rys. 1. Układ kalorymetryczny

Fig. 1. The calorimetric set

Cela pomiarowa zawierała szklaną ampulkę o objętości 10 cm³ z próbkę badanej gleby. Natomiast cela odniesienia zawierała Al₂O₃ o masie identycznej jak badana gleba. Stałość temperatury kalorymetru utrzymywano z dokładnością do ± 0,001 K przy użyciu układu termostatującego i regulatora temperatury Fluke 2100. Kalibrację celi pomiarowej przeprowadzono metodą elektryczną, z wykorzystaniem wewnętrznego 100 Ω izolowanego rezystora. Stałą moc cieplną w naczyniu pomiarowym generowano przy użyciu zasilacza prądu stałego. Na podstawie równania (1) wyliczano aktualną szybkość wydzielania ciepła (moc cieplną) w naczyniu kalorymetrycznym.

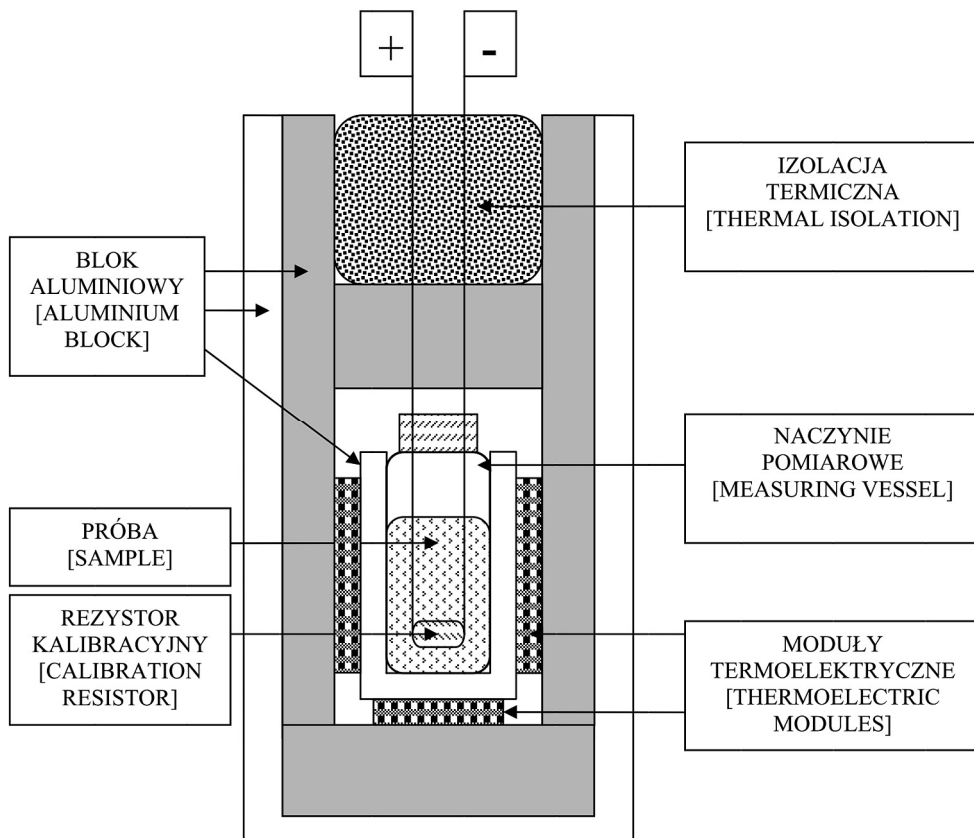
$$P = RI^2 \quad (1)$$

gdzie:

P [W] - moc cieplna

R [Ω] - rezystancja

I [A] - natężenie prądu



Rys. 2. Cella kalorymetryczna
Fig. 2. The calorimetric cell

Uzyskane wyniki kalibracji (rys. 3) pozwoliły na wyznaczenie współczynnika strat ciepłych α [$\text{W} \cdot \text{V}^{-1}$] badanego układu w zakresie przewidywanych wartości generowanej mocy cieplnej. Stałe czasowe τ [s] obliczono na podstawie krzywych oziębiania naczynia pomiarowego z wysterylizowaną glebą doprowadzoną do 60% maksymalnej pojemności wodnej.

Obliczenia kalorymetryczne przeprowadzono na podstawie wyjściowego równania Tiana (2).

$$f(t) = \Theta(t) + \tau \frac{d\Theta(t)}{dt} \quad (2)$$

gdzie:

$f(t)$ [μV] - funkcja wyrażająca przebieg badanego procesu,

$\Theta(t)$ [μV] - zmiany siły termoelektrycznej (SEM) w trakcie procesu,

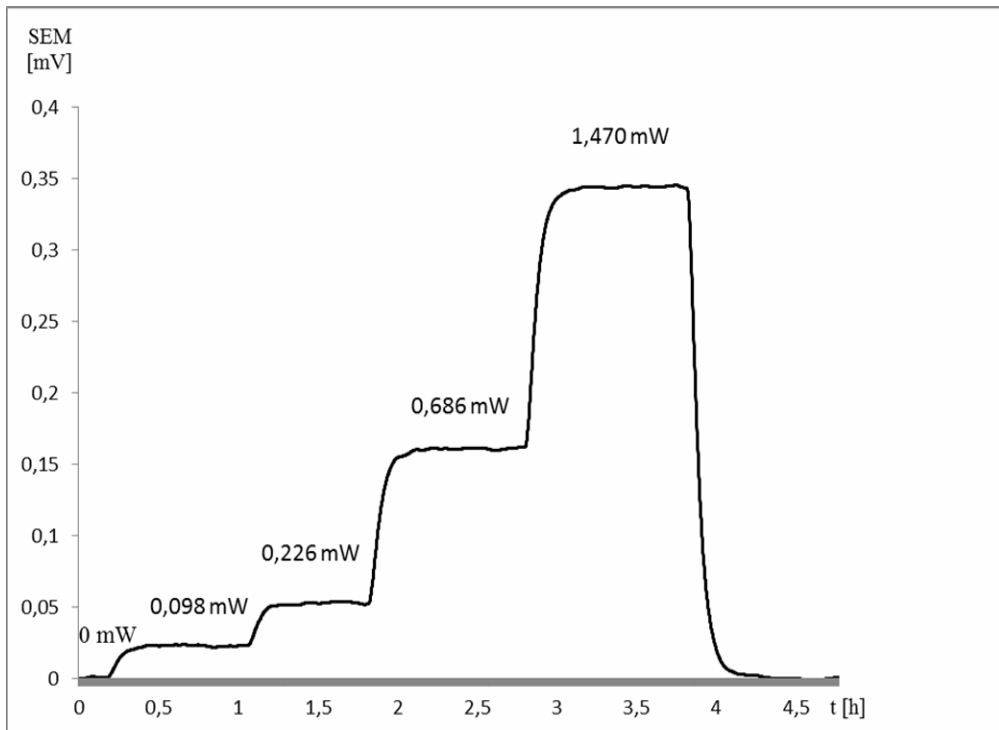
τ [s] - stała czasowa badanego obiektu.

Otrzymane wyniki pomiarów zostały wykorzystane do wyznaczenia krzywych zmian szybkości wydzielania ciepła [RHP], inaczej nazywanych termogramami, maksymalnej mocy cieplnej (RHP_{max}) po czasie PT, pozornej stałej szybkości (k) w fazie wykładniczego wzrostu dla przedziału czasowego Δt oraz „czasu generacji” (t_G) wyliczonego na podstawie zależności (3) (Wang i in. 2008).

$$t_G = \ln 2 \cdot k^{-1} \quad (3)$$

Zmiany całkowitego efektu cieplnego badanych przemian obliczano całkując przebieg funkcji $f(t)$ w przedziale czasowym t_0 - t_n na podstawie równania (4).

$$Q_t = \alpha \int_{t_0}^t f(t) \cdot dt \quad (4)$$



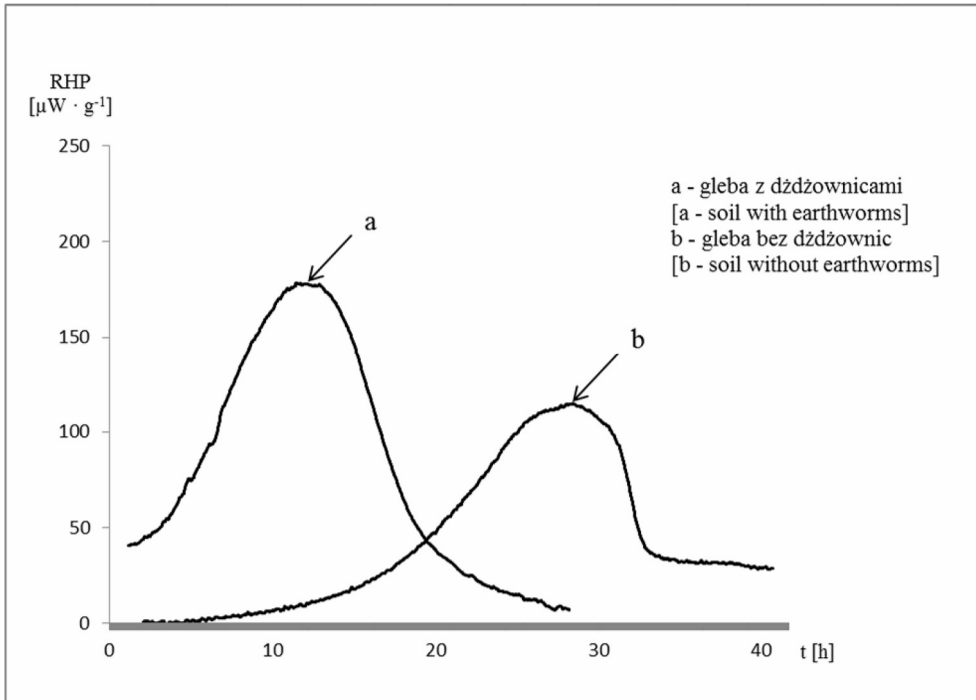
Rys. 3. Krzywa kalibracyjna kalorymetru izotermicznego
Fig. 3. The calibration curve of the isothermal calorimeter

Pomiary mikrokalorymetryczne zmian aktywności metabolicznej gleb w obecności dżdżownic przeprowadzono po około dwutygodniowym okresie inkubacji w temperaturze pokojowej, ok. 20-22°C. Próba kontrolna gleby nie zawierała dżdżownic. Przed pomiarami z gleb usunięto dżdżownice i wprowadzano roztwór siarczanu amonu ($1 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ s.m. gleby) oraz wodę. Po kolejnych 12 godzinach, do gleby w naczyniach pomiarowych dodano glukozę w postaci roztworu wodnego, a następnie próby wprowadzano do kalorymetru. Początkowa zawartość glukozy w glebie odpowiadała $1 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ s.m. gleby. Wilgotność gleby odpowiadała 60% maksymalnej pojemności wodnej. Pomiary kalorymetryczne prowadzono w temperaturze 20°C (293.15 K).

WYNIKI I DYSKUSJA

Mikrokalorymetryczne badania procesu rozkładu glukozy w glebie wykorzystuje się jako niedestrukcyjną i standardową metodę porównywania zmian aktywności metabolicznej różnych gleb. Metodą tą można również badać procesy biodegradacji innych substancji organicznych. Badania takie zwykle prowadzi się w temperaturze 25°C lub wyższych [Barros i in. 2000, Wadsö 2002, Dziejowski, Białobrzewski 2011]. Układ kalorymetryczny przedstawiony w niniejszej pracy umożliwiał ciągłe, kilkudziesięciogodzinne i niedestrukcyjne pomiary zmian aktywności metabolicznej gleby w temperaturze 20°C. Ilość tlenu w naczyniach pomiarowych wystarczała do całkowitego utlenienia glukozy dodatkowo wprowadzonej do próbek gleby.

Typowy przebieg zmiany mocy cieplnej (RHP) podczas rozkładu glukozy w badanych glebach przedstawia rys. 4.



Rys. 4. Zmiany szybkości wydzielania ciepła (RHP) podczas rozkładu glukozy w glebach a i b (a – z dżdżownicami; b – bez dżdżownic)

Fig. 4. The changes of the rate of heat production (RHP) during glucose decomposition in soils a and b (a – with earthworms; b – without earthworms)

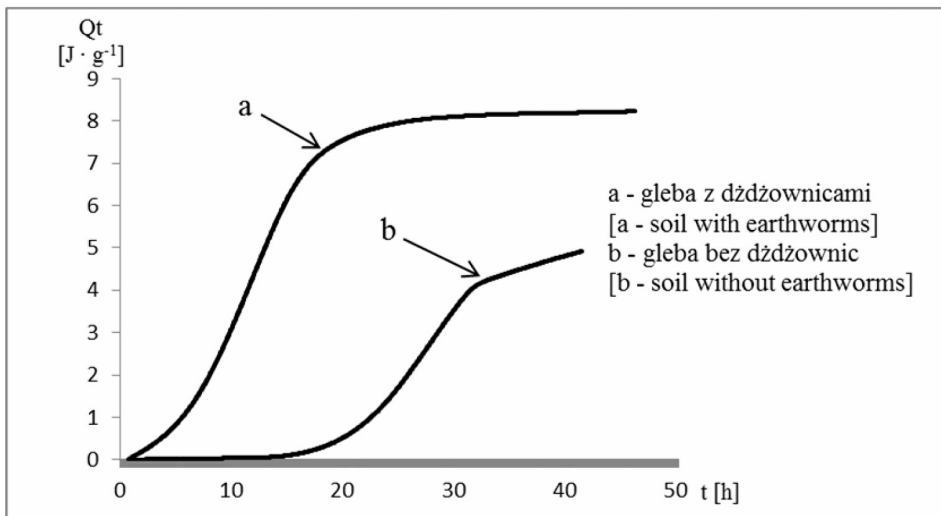
Uzyskane wyniki badań przedstawione na rys. 4, jak i w tabeli 1 wskazują na znaczne zmiany kinetyki procesu biodegradacji glukozy w glebie będącej środowiskiem bytowania dżdżownic w porównaniu z glebą kontrolną.

Tabela 1. Kalorymetryczna i kinetyczna charakterystyka rozkładu glukozy w glebach a i b
Table 1. Calorimetric and kinetic characteristics of glucose decomposition in soils a i b

Gleba [Soil]	PT [h]	RHP _{max} [$\mu\text{W}\cdot\text{g}^{-1}$]	k [h^{-1}]	Δt [h]	R ²	t _G [h]
z dżdżownicami [with earthworms] (a)	11,42	183,4718	0,2097±0,0040	4,86÷8,00	0,9830	3,3047±0,0614
bez dżdżownic [without earthworms] (b)	28,42	118,4319	0,1948±0,0045	18,14÷23,86	0,9868	3,5581±0,0806

Stwierdzono ponad dwukrotne skrócenie czasu (PT) osiągnięcia najwyższej wartości szybkości wydzielania ciepła (RHP_{max}) w glebie a „z dżdżownicami” w porównaniu z glebą bez dżdżownic (b). W glebie a wartość RHP_{max} znacznie uległa zwiększeniu. Pozorna stała szybkości (k) była wyższa. Czas generacji (t_G) wyrażający podwojenie liczby mikroorganizmów w jednostce czasu uległ zmniejszeniu. Cechą charakterystyczną krzywych a w odróżnieniu od krzywych b był zanik lag fazy mikrobiologicznego wzrostu. Taki wynik przebiegu termogramów wskazuje, że gleba, w której bytowały dżdżownice charakteryzuje się znacznie wyższą liczebnością aktywnych zespołów mikroorganizmów glebowych zdolnych do konsumpcji glukozy. Dane przedstawione w Tabeli 1 wykazują ogromny wpływ aktywności dżdżownic w glebie na zmiany jej aktywności metabolicznej.

Krzywe zmian całkowitych efektów cieplnych (Qt) procesów biodegradacji glukozy przedstawia rys. 5.



Rys. 5. Zmiany całkowitych efektów cieplnych (Qt) podczas rozkładu glukozy w glebach a i b (a – z dżdżownicami; b – bez dżdżownic)

Fig. 5. The changes of the total heat effect (Qt) during glucose decomposition in soils a and b (a – with earthworms; b – without earthworms)

Przebieg analizowanych krzywych wskazuje, że obecność dżdżownic w badanej glebie spowodowała znaczne zwiększenie całkowitej ilości wydzielonego ciepła. Powodem tego zjawiska może być zwiększenie zawartości łatwo przyswajalnego organicznego substratu stanowiącego dodatkową odżywkę dla mikroorganizmów glebowych.

Dżdżownice wpływają na zmiany właściwości mikrobiologicznych gleby, a w tym wzrost aktywności metabolicznej podczas rozkładu glukozy. Penetrując glebę tworzą otwory pełniące rolę natleniającą środowisko glebowe, a jednocześnie udostępniają składniki odżywcze dla środowiska mikrobiologicznego. Dżdżownice wydzielają śluz, który pozostaje w kontakcie z agregatami glebowymi oraz wydalają odchody, które pozostając w środowisku glebowym ulegają dalszej biodegradacji. Ten stan może wpływać na zwiększenie zawartości węgla w glebie i stymulować wzrost biomasy mikroorganizmów glebowych [Stromberger i in. 2012]. Taki wzrost zawartości węgla mikrobiologicznej biomasy (C_{mic}) wykazali w swoich badaniach Aira i in. [2007]. Dżdżownice mogą tworzyć dogodne warunki do namnażania się bakterii. Wyczółkowski i in. [2005] stwierdzili, że prawdopodobnie związane jest to z dostarczaniem dla mikroorganizmów substancji pokarmowych zawartych w koprolitach oraz cząstkach glebowych tworzących ścianki otworów drażnionych przez dżdżownice. Makropory oraz odchody dżdżownic mogą także poprawiać jakość nisz dla wzrostu roślin [Milcu i in. 2006]. Dżdżownice wpływają na obieg azotu w środowisku glebowym [Whalen, Parmelee 1999]. Wzrost dostępności azotu dla mikroorganizmów glebowych, spowodowany aktywnością dżdżownic, wpływa korzystnie na procesy rozkładu materii organicznej oraz zwiększenie ilości biomasy drobnoustrojów [Ceccanti i in. 2006].

Mikrokalorymetryczna charakterystyka kinetyki procesu biodegradacji glukozy w badanych glebach potwierdziła wyraźny wzrost aktywności metabolicznej gleby, w której bytowały dżdżownice. Opracowany przez autorów publikacji test mikrokalorymetryczny może być cennym narzędziem do badania wpływu mezofauny na aktywność metaboliczną gleb.

WNIOSKI

1. Test mikrokalorymetryczny pozwala na niedestrukcyjne badania próbek gleb poddanych działaniu mezofauny glebowej oraz analizę przebiegu procesu biodegradacji substancji organicznych.
2. Wyniki badań potwierdzają znaczne zmiany aktywności metabolicznej gleb pod wpływem działalności dżdżownic.
3. Zastosowany w badaniach prototypowy układ mikrokalorymetryczny umożliwia przeprowadzenie pomiarów zmian aktywności metabolicznej gleb w temperaturze 20°C.

PIŚMIENNICTWO

Aira M., Monroy F., Domínguez J. 2007. Earthworms strongly modify microbial biomass and activity triggering enzymatic activities during vermicomposting independently of the application rates of pig slurry. *Science of the Total Environment*, 385: 252-261.

- Barros N., Feijóo S., Fernández S., Simoni J.A., Airoidi C. 2000. Microcalorimetric study of the influence of agriculture on the microbial activity of Amazonian soils collected in riversides. *Entropie*, 224/225: 75-79.
- Bhadauria T., Saxena K.G. 2010. Role of earthworms in soil fertility maintenance through the production of biogenic structures. *Applied and Environmental Soil Science* vol. 2010: 7 p.
- Butenschoen O., Marhan S., Langel R., Scheu S. 2009. Carbon and nitrogen mobilisation by earthworms of different functional groups as affected by soil sand content. *Pedobiologia*, 52: 263-272.
- 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. *Water, Air, and Soil Pollution*, 177: 383-397.
- Critter S.A.M., Freitas S.S., Airoidi C. 2004. Microcalorimetric measurements of the metabolic activity by bacteria and fungi in some Brazilian soils amended with different organic matter. *Thermochimica Acta*, 417: 275-281.
- Dziejowski J., Białobrzewski I. 2011. Calorimetric studies of solid wastes, sewage sludge, wastewaters and their effects on soil biodegradation processes. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 104:161-168.
- Kasprzak K. 1986. Skąposzczety glebowe, III. Rodzina: dżdżownice (*Lumbricidae*). Klucze do oznaczania bezkręgowców Polski. PWN, Warszawa.
- Kostecka J., Durak R. 1997. Badania nad niektórymi czynnościami życiowymi dżdżownicy *Lumbricus terrestris* L. w warunkach laboratoryjnych. *Zesz. Nauk. PTIE i PTG Oddział w Rzeszowie*. 1: 45-49.
- Kostecka J. 1999a. Wpływ wybranych herbicydów na dżdżownice. *Zesz. Probl. Post. Nauk Roln.* 467: 609-615.
- Kostecka J. 1999b. Wpływ wybranych insektycydów na dżdżownice. *Zesz. Probl. Post. Nauk Roln.* 467: 603-607.
- Kostecka J. 2000. Badania nad wermikompostowaniem odpadów organicznych. *Zeszyty naukowe AR w Krakowie. Rozprawy*, 268: 1-88.
- Laossi K.R., Decaens Th., Jouquet P., Barot S. 2010. Can we predict how earthworm effects on plant growth vary with soil properties? *Applied and Environmental Soil Science* vol. 2010: 6 p.
- Milcu A., Schumacher J., Scheu S. 2006. Earthworms (*Lumbricus terrestris*) affect plant seedling recruitment and microhabitat heterogeneity. *Functional Ecology*, 20: 261-268.
- Piron D., Pérès G., Hallaire V., Cluzeau D. 2012. Morphological description of soil structure patterns produced by earthworm bioturbation at the profile scale. *European Journal of Soil Biology*, 50: 83-90.
- Räty M. 2004. Growth of *Lumbricus terrestris* and *Aporrectodea caliginosa* in an acid forest soil, and their effects on enchytraeid populations and soil properties. *Pedobiologia*, 48: 321-328.
- Richter K. 2010. Genetic structure in European populations of the earthworm *Lumbricus terrestris*. PhD thesis, Kassel University Press, Germany.
- Sigstad E.E., Bejas M.A., Amoroso M.J., Garcia C.I. 2002. Effect of deforestation on soil microbial activity: A worm-composite can improve quality? A microcalorimetric analysis at 25°C. *Thermochimica Acta*, 394: 171-178.
- Stromberger M.E., Keith A.M., Schmidt O. 2012. Distinct microbial and faunal communities and translocated carbon in *Lumbricus terrestris* drilospheres. *Soil Biology & Biochemistry*, 46: 155-162.
- Wadsö I. 2002. Isothermal microcalorimetry in applied biology. *Thermochimica Acta*, 394: 305-311.

- Wang F., Yao J., Tian L., Zhou Y., Chen H., Chen H., Gai N., Chen Y., Zhuang R., Zaray G., Maskow Th., Bramanti E. 2008. Microcalorimetric investigation of the toxic action of ammonium ferric(III) sulfate on the metabolic activity of pure microbes. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 25: 351-357.
- Whalen J.K., Parmelee R.W. 1999. Quantification of nitrogen assimilation efficiencies and their use to estimate organic matter consumption by the earthworms *Aporrectodea tuberculata* (Eisen) and *Lumbricus terrestris* L. *Applied Soil Ecology*, 13: 199-208.
- Wyczółkowski A.I., Dąbek-Szreniawska M., Piekarz J. 2005. Wpływ dżdżownic na zmiany ilościowe bakterii o grzybów w glebie o zróżnicowanym poziomie wilgotności. *Acta Agrophysica*, 6(1): 273-279.

THE CHANGES OF SOIL METABOLIC ACTIVITY CAUSED BY THE PRESENCE OF EARTHWORMS SPECIES *LUMBRICUS TERRESTRIS* L. – MICROCALORIMETRIC TEST

Abstract. The paper presents the results of studies of the effect of earthworms activity in the soil on the process of glucose biodegradation. The microcalorimetric test allowed to determine the kinetic parameters of examined processes in soil. An analysis of changes of the rate of heat evolution was carried out and the changes of the total heat effect were determined. The results confirmed the change in kinetics of glucose decomposition in the soil, which was the habitat of earthworms in comparison to control soil samples without earthworms.

Keywords: isothermal calorimetry, earthworms, soil, microbial activity.