Utjecaj gujavica Eisenia fetida na aktivnost mikrobne dehidrogenaze

Levačić, Marija

Master's thesis / Diplomski rad

2015

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Department of biology / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Odjel za biologiju**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:181:361794

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-19**

ODJEL ZA BIOLOGIJU
Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Repository / Repozitorij:

Repository of Department of biology, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek

zir.nsk.hr

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

ODJEL ZA BIOLOGIJU

Diplomski znanstveni studij biologije

Marija Levačić

Utjecaj gujavica *Eisenia fetida* na aktivnost mikrobne dehidrogenaze

Diplomski rad

Osijek, 2015.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku Odjel za biologiju
Diplomski rad
Diplomski sveučilišni znanstveni studij biologije

Znanstveno područje: Prirodne znanosti
Znanstveno polje: Biologija

Utjecaj gujavica *Eisenia fetida* na aktivnost mikrobne dehidrogenaze

Marija Levačić

Rad je izrađen na Odjelu za biologiju Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku.

Mentor: dr.sc.Goran Palijan, docent

Kratak sažetak:
Gujavice su jedna od najvažnijih skupina beskralježnjaka u tlu. Zbog svoje aktivnosti smatra ih se ekološkim inženjerima. Različite ekološke kategorije gujavica različito djeluju na aktivnost mikroorganizama. Provedeno je istraživanje utjecaja epigejne gujavice *Eisenia fetida* na aktivnost mikrobne dehidrogenaze u tlu tijekom šestomjesečne inkubacije mikrokozmosa sterilnog i nesterilnog tla. Praćena je i aktivnost dehidrogenaze u sadržaju probavila gujavica tijekom šestomjesečne inkubacije. U skladu s promjenama enzimske aktivnosti, očekivala se i promjena vrijednosti rezultata provedenih fizikalnih (masa suhe tvari, pepela i organske tvari) i kemijskih (pH vrijednost, električni konduktivitet) analiza tla. Aktivnost dehidrogenaze koristi se kao indikator cjelokupne mikrobiološke aktivnosti tla jer se pojavljuju u svim živim mikrobnim stanicama. Dehidrogenaza pripada razredu oksidoreduktaza te sudjeluje u biološkoj oksidaciji organske tvari. Njezina aktivnost mjerena je pomoću vodotopljive tetrazolijeve soli INT [2 (jod - fenil) - 3 (nitro - fenil) - 5 (fenil) tetrazolium klorid)]. Dobiveni rezultati pokazuju kako su gujavice imale značajan utjecaj na povećanje, odnosno smanjenje enzimske aktivnosti u istraživanim tretmanima, ovisno o periodu inkubacije. Pokazalo se kako je aktivnost dehidrogenaze u tlu veća nego u sadržaju probavila gujavica.

Broj stranica: 51
Broj slika: 22
Broj tablica: 6
Broj literaturnih navoda: 58
Broj priloga: 1
Jezik izvornika: hrvatski

Ključne riječi: tlo, gujavice, mikroorganizmi, mikrobiološka aktivnost tla, aktivnost dehidrogenaze

Datum obrane:

Stručno povjerenstvo za obranu:
1. Doc**.** dr. sc. Goran Palijan, član i mentor
2. Doc. dr. sc**.** Davorka Hackenberger Kutuzović
3. Doc. dr. sc**.** Ivna Štolfa

Rad je pohranjen u:
u knjižnici Odjela za biologiju Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku i u Nacionalnoj sveučilišnoj knjižnici u Zagrebu, u elektroničkom obliku, te je objavljen na web stranici Odjela za biologiju.

BASIC DOCUMENTACION CARD

University Josip Juraj Strossmayer in Osijek MS thesis Department of Biology Graduate Study of Biology

Scientific Area: Natural science
Scientific Field: Biology

The influence of earthworms (*Eisenia fetida*) on microbial dehydrogenase activity

Marija Levačić

Thesis performed at: Department of Biology, Osijek
Supervisor: Dr.sc. Goran Palijan**, assistant prof.**

Short abstract:
Earthworms are one of the most important groups of invertebrates in the soil. They are also considered as ecosystem engineers because of their effects on soil properties. Different ecological categories of earthworms act differently on the activity of microorganisms. The influence of epigeic earthworms *Eisenia fetida* on dehydrogenase activity in soil was investigated during six-month incubation of the microcosms which had a sterile and unsterile soil treatments. Dehydrogenase activity in earthworm's gut contents was also investigated during six-month incubation period. According to the changes of the enzyme activity under the presence of the earthworms, changes in the physical (dry weight, ash weight, and ash free dry weight) and chemical (pH value, electrical conductivity) soil properties were also expected. Dehydrogenase activity is used as an indicator of overall soil microbial activity because they occur intracellular in all living microbial cells. Soil dehydrogenases belong to the oxidoreductase enzyme class and play a significant role in the biological oxidation of soil organic matter. In this study, dehydrogenase enzyme activity was determined by the reduction of INT (iodonitrophenyl tetrazolium chloride) to INTF (iodonitrophenyl tetrazolium formazan). The results showed that earthworms had a significant effect on the increase or decrease of the enzyme activity in the investigated treatments, depending on the period of incubation. It is also shown that dehydrogenase activities in earthworm's gut contents were significantly lower than those in the surrounding soil.

Number of pages: 51
Number of figures: 22
Number of tables: 6
Number of references: 58
Original in: Croatian

Key words: soil, earthworms, microorganisms, soil microbial activity, dehydrogenase activity

Date of the thesis defence:

Reviewers:
1. Goran Palijan**,** PhD, assistant prof.
2. Davorka Hackenberger Kutuzović, PhD, assistant professor
3. Ivna Štolfa, PhD, assistant professor

Thesis deposited in
Library of Department of Biology, Unversity of J. J. Strossmayer Osijek and in National university library in Zagreb in elektronic form. It is also disposable on the web site of Departmetnt of Biology, University of J.J. Strossmayer Osijek.

Zahvaljujem mentoru doc. dr. sc. Goranu Palijanu na stručnom vodstvu, savjetima, strpljenju i pomoći tijekom izrade ovog diplomskog rada.

Hvala svim članovima Odjela za biologiju Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku koji su posredno ili neposredno sudjelovali u ostvarivanju ovog rada.

Posebno hvala kolegici Bojani i Mirti koje su mi uvelike pomogle prilikom izrade eksperimentalnog dijela ovog rada.

Veliko hvala mojoj obitelji, momku i prijateljima na podršci tijekom cijelog studija, a posebnu zahvalnost iskazujem svojim roditeljima bez kojih studiranje ne bih uspjela privesti kraju.

SADRŽAJ

1 UVOD 1

1.1 Opće značajke tla 1

1.2 Organizmi u tlu 3

1.2.1 Biologija i ekologija gujavica 7

1.2.1.1 Interakcija gujavica i mikroorganizama 9

1.3 Aktivnost mikrobne dehidrogenaze (DHA) 10

1.4 Cilj istraživanja 14

2 MATERIJALI I METODE 15

2.1 Pribor i uređaji 15

2.2 Modelni organizmi 15

2.3 Priprema mikrokozmosa 17

2.4 Fizikalno-kemijske analize tla 17

2.4.1 Određivanje mase suhe tvari u tlu 17

2.4.2 Određivanje mase pepela i organske tvari u tlu 18

2.4.3 Određivanje pH reakcije otopine tla 18

2.4.4 Određivanje električnog konduktiviteta tla 18

2.5 Spektrofotometrijsko određivanje koncentracije formazana 19

2.6 Statistička obrada podataka 20

3 REZULTATI 21

3.1 Fizikalno- kemijske analize tla ispitivanih mikrokozmosa 21

3.1.1 Masa suhe tvari 21

3.1.2 Masa pepela 23

3.1.3 Masa organske tvari 25

3.1.4 pH reakcija tla 27

3.1.5 Električni konduktivitet tla 29

3.2 Količina nastalog formazana 31

3.2.1 Količina nastalog formazana u uzorcima tla 31

3.2.2 Količina nastalog formazana u sadržaju probavila gujavice 34

4 RASPRAVA 37

5 ZAKLJUČAK 41

6 LITERATURA 42

7 PRILOZI 48

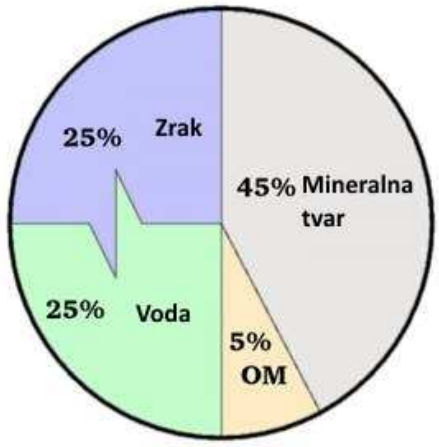
1 UVOD

1.1 Opće značajke tla

Tlo se može definirati na različite načine. Općeprihvaćena definicija opisuje tlo kao rastresit sloj na površini Zemlje, smješten između litosfere i atmosfere, nastao od matične stijene u procesu pedogeneze. Sastavljeno je od krute, tekuće i plinovite faze. Sastav i udio navedenih komponenti utječe na fizikalna i kemijska svojstva tla (McCauley i sur., 2005). Tlo predstavlja stanište mnogobrojnih organizama. Fizikalna i kemijska svojstva tla određuju vrstu i broj organizama u tlu. Fizikalna svojstva tla čine: tekstura, struktura, poroznost, konzistencija i boja tla. Tekstura tla označava mehanički, tj. granulometrijski sastav tla (udio pijeska, praha i gline). Frakcije se razlikuju kako po veličini, tako i po kemijskom i mineralnom sastavu. Određuje kapacitet tla za vodu i zrak, hranidbeni potencijal te adsorpcijsku sposobnost tla. Strukturu tla opisuje veličina, oblik i raspored agregata u profilu tla. Agregati predstavljaju nakupine mineralnih čestica, povezanih koloidima organske prirode te inkrustrirane anorganskom tvari (Paul i Clark, 1989). Prema veličini dijele se na mikroagregate (0,002–0,2 mm), mezoagregate (0,2-0,25) i makroagregate (>0,25). Struktura utječe na kretanje vode i zraka u tlu te na biološku aktivnost. Poroznost tla označava ukupan udio pora u tlu. Pore predstavljaju prazan prostor između čvrstih (mineralnih i organskih) komponenti tla. Mogu zauzimati različit volumni udio u tlu, od 35 % (mineralna tla) do 90 % (organska tla). Njihova veličina ovisi o teksturi i strukturi tla te sadržaju organske tvari. Konzistencija tla jest posljedica djelovanja sila kohezije i adhezije unutar tla pri različitoj količini vode. Uvjetuje ˝ponašanje˝ tla za vrijeme deformacije. Ovisi o teksturi i strukturi tla, sadržaju organske tvari te vodi u tlu. Boja tla je važan pokazatelj određenih svojstava tla, određena je kemijskim i mineralnim sastavom tla. Osnovne boje su smeđa, crvena i žuta, a povezane su s različitim stupnjem oksidacije, hidratacije i količinom željeznih oksida u tlu (Shukla i Varma, 2011). Kemijska svojstva tla određuje: reakcija pH otopine tla, sorpcija i salinitet.

pH vrijednost može varirati, od ekstremno kiselih do jako alkaličnih vrijednosti. Kisela tla sadrže manje karbonata i više silikata, a bogata su metalima (Cu, Al, Zn, Co). Bazična tla su bogata karbonatima dok su siromašna metalima i fosfatima (Jhonson, 2009). pH vrijednost utječe na biološku aktivnost u tlu, odnosno dostupnost hranjivih tvari u tlu. Kisela tla smanjuju bakterijsku aktivnost, a time i proces razgradnje hranjivih tvari. Sorpcija je važno svojstvo koje omogućuje vezanje vode i u njoj otopljenih čestica (anorganskih i organskih) na površini krutih čestica. Ovisi o svojstvima koloida tla, svojstvima kationa te koncentraciji otopine tla. Minerali i organski koloidi čine adsorpcijski kompleks tla (izmjenjivački kompleks). Salinitet tla je rezultat akumulacije topivih soli u tlu. Te soli uključuju ione kalija, magnezija, klora, natrija te sulfate i karbonate. Akumulacija natrija povezana je sa sodicitetom. Mjeri se kao vrijednost električne vodljivosti zasićenog uzorka tla. Tlo može biti neslano do vrlo jako zaslanjeno. Povećanjem saliniteta, povećava se osmotski pritisak te toksičnost određenih elemenata.

Tlo je sastavljeno od krute (organska i anorganska tvar), tekuće (vodena otopina tla) i plinovite faze (Jhonson, 2009). Približan udio pojedinih komponenti prikazuje slika 1.



Slika 1. Komponente tla: mineralna tvar, zrak, voda i organska tvar. Prikazane postotne vrijednosti vrijede za tlo u optimalnim uvjetima (prilagođeno prema web 1).

Anorganske tvari krute faze tla čine mineralne tvari, podrijetlom iz eruptivnih, sedimentnih i metamorfnih stijena. Većina mineralne tvari u tlu dolazi u vezanom obliku, u obliku teško topivih fosfata i karbonata dok je manji dio adsorptivno vezan za čestice tla ili se nalazi u otopini tla. Najviše su zastupljeni elementi: silicij (Si), aluminij (Al), željezo (Fe), kalcij (Ca), magnezij (Mg), kalij (K) i natrij (Na). U malim količinama ima fosfora (P) i sumpora (S). Otapanjem minerala (korijen biljke izlučuje različite tvari) mijenjaju se životni uvjeti

mikroorganizama u području rizosfere. Organska tvar jest materijal biljnog i životinjskog podrijetla, nastao u tlu ili je u njega unesen, neovisno o stupnju razgradnje. Količina i vrsta organske tvari u tlu utječe na njegova kemijska, fizikalna i biološka svojstva (Jhonson, 2009). Prema Lavelle (2001) i Spain (2001) organska tvar u tlu dolazi u sljedećim oblicima:

- Biljni i životinjski ostatci koji se gomilaju na površini tla, u mineralnom horizontu;
- Djelomično razgrađeni oblici biljnog i životinjskog podrijetla ispod površine tla;
- Živući makro- i mikro-organizmi;
- Mukozne izlučevine biljnog i životinjskog podrijetla;
- Humusni materijal

Živući makro-organizmi lako se izdvajaju iz tla te se obično ne smatraju organskom tvari u tlu. Mikroorganizmi i manji beskralježnjaci (mikro- i mezofauna) čine mikrobijalnu biomasu tla (Lavelle i Spain, 2001). Fizikalne i kemijske osobine organske tvari znatno se razlikuju, ovisno o relativnim omjerima komponenata koje čine organsku tvar (Lavelle i Spain, 2001). Funkcije organske tvari su fizikalne, kemijske i biološke prirode. Služi kao izvor i rezerva hranjivih tvari u tlu. Sudjeluje u stvaranju stabilnih agregata te štiti površinu tla od isušivanja. Održava niz bioloških funkcija tako što utječe na aktivnost mikroflore i mikrofaune. Nadalje, omogućava izmjenu iona i skladištenje ugljika u tlu (Craswell i Lefroy, 2001).

1.2 Organizmi u tlu

Organizmi u tlu imaju esencijalnu ulogu u funkciji tla. Uključeni su u procese nakupljanja i razgradnje organske tvari, sinteze humusa, biološkog kruženja tvari, oksidaciji i redukciji mineralnih elemenata te ukupne primarne proizvodnje (Menta, 2012). Predstavljaju jedan od najznačajnijih rezervoara bioraznolikosti. Prema različitim autorima općeprihvaćeno je pet glavnih kategorizacija: prema (1) strategiji hranjenja, (2) načinu kretanja u tlu, (3) vremenu provedenim u tlu, (4) lokaciji u profilu tla i (5) prema veličini tijela (Wallwork, 1970).

Prema strategiji hranjenja pedofauna se dijeli na karnivore, herbivore (fitofage), detritovore (saprofage) i omnivore (Wallwork, 1970; Hasiotis, 2000). Na temelju lokomocije u tlu, biota se dijele na životinje koje žive u hodnicima te one koje se kreću kroz pore tla, šupljine i kanale u tlu. Vrijeme zadržavanja organizama u tlu varira, ovisno o vrsti organizma. Tako se dijele na geobionte i geofile (Wallwork 1970; Hasiotis, 2000). Među geobionte pripadaju organizmi koje borave u tlu tijekom svih životnih stadija. Uključuje protozoe, nematode, anelide, myriapode, isopode, kolembole, određene vrste insekata (Coleoptera) i neke molusca (Gastropoda). Takvi organizmi čine veliki udio biomase i bioraznolikosti u ekosistemu tla. Većina njih je dio mikro- i mezofaune (Hasiotis, 2000). Geofili su podijeljeni na inaktivne i aktivne. Inaktivni se smatraju prolaznom faunom, ulaze u tlo tek kada iznad površine tla vladaju nepovoljni uvjeti. Spomenutu skupinu uglavnom čine određene vrste insekata. Aktivnu skupinu geofila čine holometabolni insekti (Diptera, Coleoptera, Lepidoptera). Imigracija (imago polažu jaja u tlo) i emigracija (kukac izlazi iz tla nakon sazrijevanja) uzrokuju veliku varijabilnost u veličini populacije. Aktivni geofili se dodatno dijele u dvije grupe (1) privremenu i (2) periodičnu. Privremenu čine organizmi koji jedan aktivni stadij borave u tlu, dok su u drugom aktivnom stadiju izvan tla (npr. pčele koje gnijezde u tlu). Periodična grupa organizama provodi više vremena u tlu nego privremena grupa. Čine je mravi, termiti i gujavice.

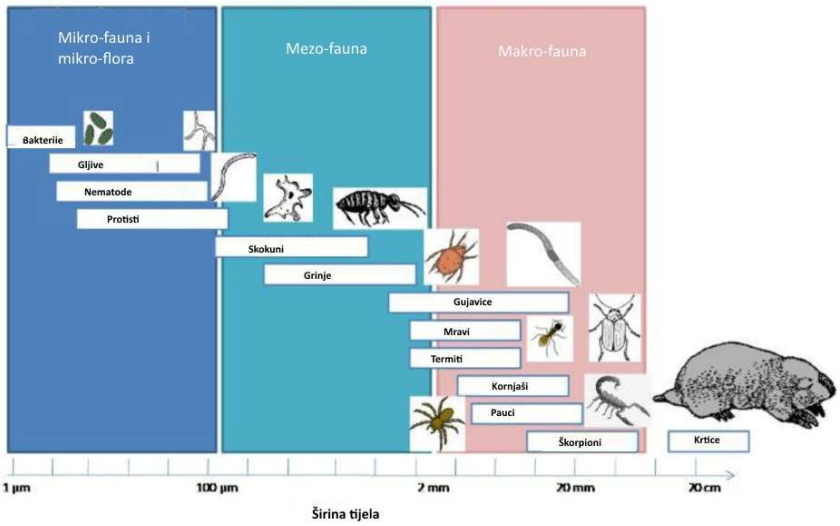
Prema položaju koji zauzima u profilu tla, fauna se dijeli na:

1. Epiedafon čine organizmi koji žive na gornjem sloju tla i sloju stelje (grinje, pauci, mravi, pčele).

2. Hemiedafon čine organizmi koji žive unutar zemljine kore (endogejne gujavice, stonoge, nematode, voluharice).

3. Organizmi koji žive u dubljim slojevima zemljine kore čine euedafon. To su endogejne vrste gujavica i ličinke nekih kukaca.

Podjelu organizama u tlu prema veličini tijela prikazuje slika 2. Dijele se na mikrofloru i mikrofaunu, mezofaunu, makrofaunu i megafaunu.



Slika 2. Podjela biota tla s obzirom na veličinu tijela (prilagođeno prema web 2).

Mikrofloru čine organizmi čija je veličina tijela manja od 100 µm. Ovdje pripadaju najbrojniji članovi hranidbene mreže tla, a to su: bakterije, gljive, virusi, aktinomicete i alge. Njihova prostorna raspodjela u tlu je fragmentirana. Uglavnom su agregirani oko korijenja, nakupinama organske tvari te u mukoznim izlučevinama ostalih organizama u tlu. Važni su za procese humifikacije i mineralizacije organske tvari. Većinu biomase mikroflore čine bakterije i gljive. Bakterije su najbrojnije u gornjim slojevima tla, a s dubinom tla brojnost se smanjuje. Dolaze u obliku koka (0,5 µm), bacila (0,3-0,5 µm veće osi) i spirila. Bacili su uobičajeni u tlu dok su spirili vrlo rijetki u prirodnom okruženju. Također se mogu podijeliti na saprofite i patogene. Izlučuju ljepljive supstance u obliku polisaharida, što doprinosi povezivanju čestica tla u male agregate. Time doprinose stabilnosti tla. Cijanobakterije su vrlo važne za formiranje biološke kore tla. Nalaze se u prvih 10 cm površinskog sloja tla. Vežu čestice tla u male agregate i tako štite tlo od erozije. Filamentima mogu apsorbirati vodu u tlu i tako povećati volumen tijela do deset puta (Shukla i Varma, 2011). Time doprinose očuvanje vlage gornjeg sloja tla. Uspostavljaju simbiotske odnose s biljkama, gljivama i lišajevima. Gljive u tlu dolaze u mikroskopskim veličinama u obliku micelija (nakupine hifa). Zauzimaju važnu ulogu u dinamici vode u tlu, kruženju hranjivih tvari i suzbijanju bolesti. Važne su za procese razgradnje u kopnenim ekosistemima. Dijele se u četiri funkcionalne grupe:

1. Razlagači (saprofitne gljive), konvertiraju mrtvu organsku tvar u fungalnu biomasu, ugljični dioksid i organske kiseline.

2. Mutualisti; razvijaju mutualističke odnose s biljkama, npr. mikorizne gljive koloniziraju korijene biljaka. Imaju važan učinak na fizikalne karakteristike tla. Hifama tvore mrežu kojom stabiliziraju agregate tla.

3. Patogene gljive; prodiru u biljke i razgrađuju živuće tkivo.

4. Predatorske gljive; razvile su različite načine hvatanja i ubijanja plijena, najčešće nematoda (nematofagne gljive).

Alge se nalaze na površini vlažnih tala gdje ima dovoljno svjetlosti za odvijanje fotosintetskih reakcija. Proizvode složene organske spojeve i time doprinose kruženju hranjivih tvari.

Mikrofaunu čine organizmi čija je veličina tijela između 20 i 200 μm. Ovdje pripadaju skupine nematoda i protozoa. Uglavnom se hrane mikroflorom, korijenjem biljaka, drugim pripadnicima mikrofaune, ponekad i većim beskralježnjacima. Transformiraju organsku tvar, usitnjavaju je, miješaju i razgrađuju. Ova skupina je važna za otpuštanje hranjive tvari koju je imobilizirala mikroflora. Protozoa su slobodnoživući organizmi koji gmižu ili plivaju u vodenoj otopini tla. Uglavnom su distribuirani u prvih nekoliko centimetara gornjeg sloja tla. Većina su predatori. Hraneći se bakterijama, ubrzavaju ciklus kruženja dušika, čineći ga dostupnim biljkama (Jhonson, 2009). Slobodnoživuće nematode predatori su bakterija i gljivica. Kontroliraju njihovu populaciju i kruženje nutrijenata.

Mezofauni pripadaju organizmi veličine tijela između 200 μm i 2 mm. Glavni predstavnici su mikroartropode (grinje i skokunci). Također je čine određene nematode, rotifera, tardigrade i larve insekata. Uglavnom žive u porama tla, hrane se organskom tvari, mikroflorom i mikrofaunom. Stvaraju feces i pore u tlu što povoljno utječe na kvalitetu tla.

Makrofauni pripadaju organizmi veličine tijela između 2 mm i 20 mm. U ovu kategoriju su uključene neke vrste gujavica, puževa, izopoda, myriapoda, nekih paučnjaka i većine insekata. Zbog svoje aktivnosti, uključujući kretanje i hranjenje, makrofauna predstavlja važan regulator dekompozicije organske tvari, kruženja nutrijenata i kretanja vode u tlu.

Megafaunu čine organizmi čija veličina tijela prelazi 20 mm. Ovdje pripadaju gujavice i manji kralježnjaci (insektivorni glodavci, gmazovi i vodozemci). Kralježnjaci nemaju velik značaj u transformaciji organske tvari,već aeriraju i agregiraju tlo. Ugibanjem obogaćuju rezervoar mrtve organske tvari i direktno utječu na fizikalna svojstva tla (Paul i Clark, 1989).

1.2.1 Biologija i ekologija gujavica

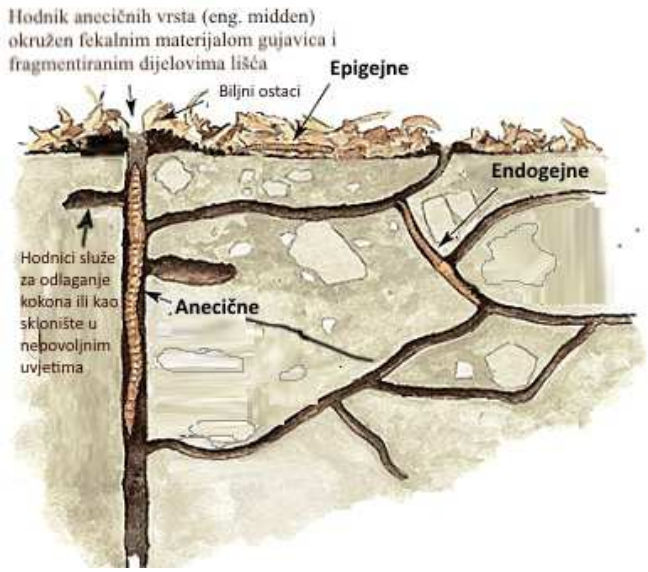
Gujavice su eukariotski, višestanični organizmi. Kao i ostali pripadnici kolutićavaca, imaju segmentirano tijelo prekriveno kožom. Segmenti su odijeljeni pregradama. Na prednjem dijelu tijela razlikuje se izbočina- akron. Iza akrona nalazi se metastomij s ustima, iza čega dolaze kolutići trupa. Tijelo obavija jednoslojna epiderma koja je pokrivena kutikulom. Ispod epiderme se nalazi mišićni sloj. U unutrašnjosti tijela se nalazi celom kolutićavog rasporeda. Svaki kolutić sadrži lijevu i desnu celomsku vrećicu koje su ispunjene tekućinom što ima funkciju hidroskeleta. Imaju ljestvičav živčani sustav. Oči se nalaze na prostomiju. Epidermalne fotoreceptore, kao i receptore za dodir, imaju po cijelom tijelu. Kemoreceptori se nalaze u blizini usta. Imaju ekstracelularnu probavu i zatvoren optjecajni sustav. Dišu kožom koja je uvijek vlažna. U svakom kolutiću ima dvije cjevčice za izlučivanje. Gujavice su hermafroditi. Gonade su raspoređene metamerno u parovima.

Mogu se podijelit u ekološke kategorije koje predstavljaju funkcionalnu adaptaciju gujavica na uvjete u tlu u kojem žive (Edwards i Bohlen, 1996). Kategorije se razlikuju, kako po morfološkim i fiziološkim osobinama tako i po načinu raspodjele gujavica u tlu. Poznate su tri ekološke kategorije (Bouche, 1977) (slika 3):

Epigejne- žive na površini tla, ispod biljnih ostataka. Manje su veličine i više pigmentirane no pripadnici ostalih kategorija. Fitofagne su. Imaju relativno visoku stopu reprodukcije i vrlo brzog su rasta. Neki od predstavnika su: *Dendrobaena octaedra, Lumbricus rubellus*, *Eisenia andrei, Eisenia fetida* (živi u tlu bogatom organskom tvari, kompostna vrsta).

Endogejne- žive u unutrašnjosti tla, u mineralnom sloju (do 15 cm od površine tla). Grade nepermanentne horizontalne hodnike. Nepigmentirane su ili slabo pigmentirane. Dolaze u različitim veličinama. Geofagne su. Pojedini predstavnici su: *Aporrectodea rosea*, *Aporrectodea caliginosa*, *Octolasion lacteum*.

Anecične: žive u unutrašnjosti tla (do 3 m dubine). Grade permanentne i semi-permanentne vertikalne hodnike koji vode u mineralni sloj tla, a otvaraju se na površini tla gdje se hrane. Na dorzalnoj strani tijela su srednje pigmentirane, dok su na ventralnoj strani nepigmentirane. Uglavnom su velike i geofitofagne. Najznačajniji predstavnici su: *Lumbricus terrestris*, *Aporrectodea longa*.



Slika 3. Tri ekološke kategorije gujavica; epigejne, endogejne i anecične (njihov položaj u profilu tla) (prilagođeno prema web 3).

Na temelju prirodne prehrane dodatno se dijele na detritovore i geofage (Board, 2008). Detritovori se hrane organskom tvari biljnog i životinjskog podrijetla, u blizini površine tla. Nazivaju se ″graditeljima″ humusa, a uključuju epigejne i anecične vrste. Primjeri detritovornih oblika su: *Eisenia fetida, Polypheretima elongata* i *Perionyx excavatus*. Geofagi se hrane dublje ispod površine tla. Uzimaju veću količinu tla bogatog organskom tvari. Nazivaju se ″žderačima″ humusa te uključuju endogejne vrste. Primjer takvih jest *Metaphire postuma* i *Octochaetona thurstoni.*

Gujavice zauzimaju jednu od glavnih uloga u fragmentaciji, razgradnji i inkorporaciji organske tvari (Edwards i Bohlen, 1996). S površine tla uzimaju djelomično razgrađenu tvar biljnog porijekla, gutaju je, fragmentiraju, a zatim transportiraju u podzemne slojeve tla. Proizvode feces (eng. *casts*) koji talože na površinu tla ili u hodnike u tlu, ovisno od vrste do vrste, što utječe na razvoj horizonta tla. Na taj način pretvaraju tlo u zrnastu rastresitu masu. Različite vrste gujavica različito utječu na formaciju tla. Neke vrste konzumiraju većinom anorganske frakcije tla dok se neke hrane isključivo raspadajućom organskom tvari.
Sve vrste u određenoj mjeri doprinose usitnjavanju i miješanju organske i anorganske tvari tla. Tijekom prolaza kroz probavni sustav gujavica, različite anorganske tvari se miješaju s organskom tvari te formiraju agregate. Agregati poboljšavaju drenažu i kapacitet vlaženja tla.
Zbog važne uloge u održavanju strukture tla nazvane su inženjerima ekoloških sustava.

Kretanjem kroz matriks tla prave hodnike. Tip i veličina hodnika ovisi o ekološkoj kategoriji gujavica. Hodnici su cilindrična oblika, obloženi sluzi. Izgradnjom hodnika povećavaju udio makropora te poboljšavaju aeraciju i drenažu tla.

Tijekom hranjenja potiču mikrobiološku aktivnost u tlu što pak ubrzava razgradnju i stabilizaciju humusnog djela organske tvari (Edwards, 1994). Povećavaju stopu mineralizacije organske tvari i time utječu na kruženje nutrijenata i čine ih dostupnim biljkama.

Hraneći se organskom tvari utječu na snižavanje stope ugljika i dušika u organskoj tvari. Većinu dušika konvertiraju u amonijeve ili nitratne spojeve dok fosfor i kalij konvertiraju u biljkama dostupne oblike (Edwards, 1994).

1.2.1.1 Interakcija gujavica i mikroorganizama

Utvrđeno je nekoliko vrsta odnosa između gujavica i mikroorganizama: (1) mikroorganizmi predstavljaju dio prehrane gujavica, (2) mikroorganizmi se umnožavaju u crijevima gujavica, (3) gujavice pridonose distribuciji mikroorganizama, (4) zajedničkim djelovanjem mineraliziraju i humificiraju organsku tvar te omogućuju keliranje određenih metalnih iona (Lavelle i sur., 1995). Interakcija gujavica i mikrobne zajednice tla može se promatrati kroz tri prostorne skale (Edwards, 1994). Mikroskalu predstavlja probavni sustav gujavica te hodnici u tlu nastali kretanjem gujavica. Mezoskalu čini drilosfera s okolnim tlom, dok makroskalu čini cijelo zemljište koje obuhvaća širi plan prostora. Dio tla koji je pod utjecajem gujavica naziva se drilosfera (Lavelle, 1996). Prema Buche (1975), drilosfera se definira kao zona 2 mm debljine koja okružuje hodnike gujavica. Zonu čine četiri komponente: (1) pojedinačne gujavice, uključujući mikrookoliš probavnog sustava gujavica te (2) tlo koje je u doticaju s vanjskom površinom gujavice uključujući i ekskrete gujavica, (3) površina izmeta gujavica i dio iznad te (4) hodnike gujavica. Svaka od navedenih komponenti može imati kontrastni učinak na mikrobiološku aktivnost ovisno o vremenskoj skali (Brown i sur., 2000). Pojedina komponenta može stimulirati mikrobnu aktivnost tijekom kraćeg vremena, dok tijekom dužeg vremena može reducirati mikrobnu aktivnosti i obratno. Mikroorganizmi se u značajnoj koncentraciji nakupljaju na zidovima hodnika i 2 cm od zida u okolno tlo. To mikrookruženje sadrži od 5 do 25% cijele mikroflore tla (Lavelle i Spain, 2001).

Kroz drilosferu gujavice djeluju na mikrobnu zajednicu tla, ujedno i na mikrobiološke procese vezane za razgradnju organske tvari i kruženje nutrijenata. Gutanjem velike količine tla, gujavice imaju sposobnost izazvati velike promjene u biomasi, aktivnosti i strukturi mikrobne zajednice tla (Nechitaylo i sur., 2010). Različite ekološke kategorije gujavica različito djeluju na mikrobnu zajednicu tla (Brown i sur., 2000). Endogejne vrste mogu smanjiti mikrobnu biomasu u tlu (Scheu i sur., 2002), dok epigejne i anecične vrste mogu povećati mikrobnu biomasu i aktivnost (Edwards i Bohlen, 1996; Jirout i Pizl, 2014). Epigejne vrste induciraju porast mikrobiološke aktivnosti zbog veće površine za razgradnju, smanjuju imobilizaciju površinske stelje i mijenjaju sastav mikrobne zajednice (Scheu i sur. 1994). Kompleksan utjecaj gujavica na tlo može rezultirati pozitivnim ili negativnim učinkom na mikrobnu biomasu i aktivnost u tlu, ovisno o tipu mikroorganizama i stupnju disturbancije (McLean i sur., 2006). Stupanj disturbancije povezan je s vremenom u kojem se tlo nalazi u probavilu gujavice. Kod epigejnih vrsta to je 3-8 sati, dok je kod anecičnih 12-20 sati (Edwards i Fletcher, 1988; McLean i sur. 2006).

1.3 Aktivnost mikrobne dehidrogenaze (DHA)

Djelovanje enzima značajno je u svim sferama pa tako i tlu. Enzimi u tlu čine važnu skupinu bioloških katalizatora koji imaju ključnu ulogu u održavanju ekologije tla, fizikalnih i kemijskih svojstava te plodnosti tla. Sudjeluju u metaboličkim reakcijama, prenošenju energije između živih sustava te u sintezi različitih staničnih sastojaka. Zbog specifičnih aktivnosti koju obavljaju, predstavljaju najvažnije faktore za određivanje bioloških aktivnosti i funkcija što obavlja stanica. Dijele se u četiri kategorije (Shukla i Varma, 2011):

1. Enzimi živih, metabolički aktivnih stanica u tlu; nalaze se u staničnoj citoplazmi, vezani na staničnu stijenku ili izvan stanice (netom proizvedeni).

2. Enzimi aktivnih, ali ne proliferirajućih stanica (npr. spore).

3. Enzimi mrtvih stanica ili staničnih ostataka koji su se odvojili od umirućih stanica koje su ih proizvele.

4. Enzimi koji su trajno imobilizirani na podlozi tla ili u humusnim koloidima. Takvi enzimi mogu zadržati svoju aktivnost duže razdoblje.

Odraz su metaboličke aktivnost tla koja ovisi o fizikalnim, kemijskim i biokemijskim svojstvima koji prevladavaju u tlu (Shukla i Varma, 2011). Nadalje, osjetljivi su pokazatelji ekoloških promjena. U tu skupinu ubrajaju se oksidoreduktaze, hidrolaze, izomeraze, liaze i ligaze. Neophodni su za održavanje životnih procesa mikroorganizama, stabilizaciju strukture tla, razgradnju organske tvari i kruženje nutrijenata (Sinsabaugh i sur., 1991). Enzimi u tlu mogu biti konstitutivni (uvijek prisutni u stalnim količinama, npr. pirofosfataze) i inducibilni (prisutni u tragovima čija se koncentracija povećava dodatkom substrata, npr. amidaza, celulaza). Enzimi u tlu podrijetlom su od mikroorganizama, korijenja biljaka, životinja u tlu te biljnih i životinjskih ostataka.

Mikrobna dehidrogenaza je jedan od najvažnijih enzima u tlu. Koristi se kao pokazatelj cjelokupne mikrobiološke aktivnosti tla (Wolinska i Stepniewska, 2012), zato što se pojavljuje u svim živim mikrobnim stanicama (Moeskops i sur., 2010). Određivanje aktivnosti enzima može dati veliku količinu podataka o biološkoj osobini tla (Wolinska i Stepniewska, 2012). Smatra se kako je aktivnost dehidrogenaze jedan od boljih pokazatelja mikrobiološke aktivnosti zato što se pojavljuje intracelularno, za razliku od drugih enzima koji se mogu naći i u ekstracelularnoj sredini (Subhani i sur., 2001). Čini sastavni dio intaktnih dijelova stanica mikroorganizama, bez ekstracelularne akumulacije u tlu. Pripada razredu oksidoreduktaza (uklanja dva vodikova atoma u oksidacijsko-redukcijskim reakcijama). Sudjeluje u oksidaciji organske tvari u tlu, prijenosom elektrona i protona od organskog supstrata ka anorganskom akceptoru. Predstavlja dio enzimatskog sustava mikroorganizama (enzimi respiratornog metabolizma, ciklus limunske kiseline i metabolizam dušika) (Kumar i sur., 2013) te odražava ukupnu oksidativnu aktivnost mikroflore u tlu (Liang i sur., 2014).

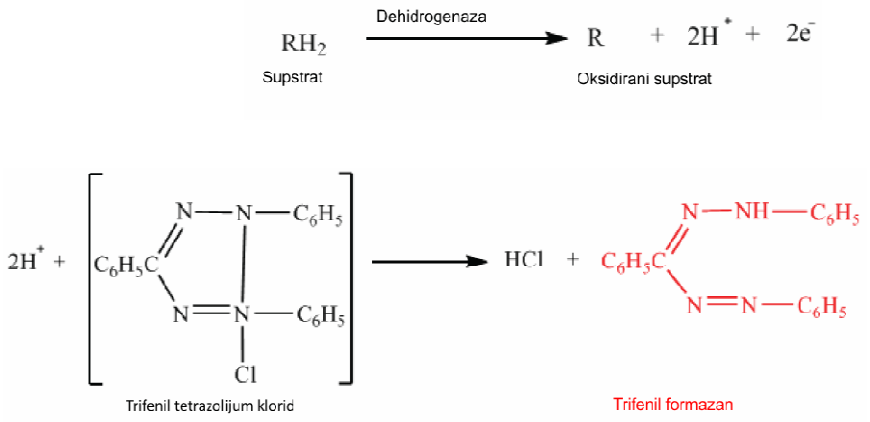
Mnogi faktori u tlu utječu kako na mikrobnu masu u tlu tako i na mikrobnu aktivnost. Neki od faktora koji utječu na aktivnost dehidrogenaze su: pH tla, temperatura, vlaga, koncentracija kisika, organska tvar, pesticidi i teški metali. pH tla može imati značajan učinak na mikrobnu aktivnost u tlu. Pretpostavlja se da na enzime u tlu utječe na tri načina (Wolinska i Stepniewska, 2012; Shuler i Kargi, 2010): Mijenja ionski oblik aktivnog mjesta enzima što utječe na samu aktivnost enzima i brzinu reakcije, mijenja trodimenzionalni oblik enzima, te utječe na afinitet prema supstratu.

Trevors (1984) je zabilježio vrlo malu aktivnost ispod pH 6.6 i iznad pH 9.5. Optimalna aktivnost mikrobne dehidrogenaze pokazala se pri rasponu između pH 7.4 i 8.5 (Nagatsuka i

Furusaka, 1980). Kako se dehidrogenaza nalazi unutar stanica mikroorganizama, najvišu aktivnost bi trebala postići na temperaturi koja je najbliže optimalnoj temperaturi za rast i razvoj mikroorganizama (Wolinska i Stepniewska, 2012). Casida i sur. (1964) pokazali su kako je aktivnost dehidrogenaze u tlu inkubiranom pri 37˚C veća nego u tlu inkubiranom pri nižim temperaturama. Vlaga u tlu značajno mijenja populaciju mikroorganizama u tlu i njihovu aktivnost. Povećana vlaga u tlu dovodi do povećane koncentracije otopljene organske tvari u tlu što može dovesti do povećanja bakterijske populacije (Subhani i sur., 2001). Mala dostupnost vode može inhibirati mikrobiološku aktivnost. Smanjenjem intracelularnog vodnog potencijala smanjuje se hidratacija, a time i enzimska aktivnost. Parametri aeracije tla kao što su stopa difuzije kisika i redoks potencijal u negativnoj su korelaciji s aktivnošću dehidrogenaze (Wolinska i Stepniewska, 2012). Aktivnost dehidrogenaze indirektno ovisi o stopi difuzije kisika u tlu. Zabilježeno je kako je aktivnost dehidrogenaze veća u anaerobno inkubiranom tlu nego u aerobno inkubiranom tlu (Subhani i sur., 2001). Organska tvar također ima važan učinak, kako na enzime u tlu, tako i na ukupnu aktivnost mikroorganizama, njihov rast i produkciju enzima. Literaturni podaci pokazuju pozitivnu korelaciju između aktivnosti dehidrogenaze i sadržaja organske tvari u tlu (Wolinska i Stepniewska 2012; Yuan i Yue 2012). Dubina profila tla jest najpoznatiji okolišni faktor koji smanjuje razinu dehidrogenaze u tlu (Wolineska i Stepniewska, 2012). Brojnost mikroorganizama najviša je u površinskom sloju (dubine do 30 cm), povećanjem dubine tla smanjuje se i broj mikroorganizama, a posljedično i aktivnost dehidrogenaze. Kako je aktivnost dehidrogenaze indikator kvalitete tla i mikrobiološke aktivnosti, često se koristi za utvrđivanje utjecaja polutanata (pesticidi ili pretjerana gnojidba) na mikrobiološku kvalitetu tla. Utvrđeno je kako neki pesticidi (Fonofos, MCPA) imaju negativan učinak na aktivnost dehidrogenaze, dok neki pesticidi (Glyphosate) stimuliraju aktivnost dehidrogenaze (Wolinska i Stepniewska, 2012). Teški metali u tlu smanjuju aktivnost enzima. Stupaju u interakciju s enzim-supstrat kompleksom, denaturiraju proteine ili se vežu na aktivno mjesto enzima i time onemogućuju njihovo normalno funkcioniranje. Dokazano je kako metali (Cd, Ni, Pb, Zn) i anorganske soli reduciraju aktivnost dehidrogenaze (Subhani i sur., 2001).

Aktivnost dehidrogenaze (DHA) određuje se pomoću vodotopivih, tetrazolijevih soli koje prodiru u stanice mikroorganizma. Kako imaju veći afinitet za elektrone od kisika, istiskuju kisik s mjesta terminalnog akceptora elektrona i djeluju kao akceptori. Kao posljedica reakcije formira se crveno-obojeni produkt (formazan). Nakon ekstrakcije organskim otapalom, proizvodnja formazana može se kvantitativno odrediti spektrofotometrijskim mjerenjem (Paul

i Clark, 1989). Aktivnost dehidrogenaze izražena je kao količina formazana nastalog u jedinici vremena. Ukratko, ako su testirani uzorci crvene boje analize su intenzivnije, izmjerena razina DHA jest veća. Slijedom toga, neobojeni uzorci tla, ili oni koji su svjetlije obojeni odlikuju se nižom razinom vrijednosti DHA. Prvu metodu za dokazivanje DHA uveo je Lenhard (1956). Metoda se temelji na redukciji TTC (2,3,5, trifenil tetrazolium klorid) u TPF (trifenilformazan). Mehanizam redukcije TTC prikazan je na slici 4. Benefield (1977) i Trevors (1982) razvili su metodu redukcije INT [2 (jod - fenil) - 3 (nitro - fenil) - 5 (fenil) tetrazolium klorid)] (Gong, 1997). Redukcijom tetrazolijevih soli formira se crveno obojeni formazan koji je netopiv u vodi. Interpretacija rezultata testova može biti teška zato što na život mikroorganizama u tlu utječu brojni okolišni faktori. Koji će se test koristiti ovisi o tipu tla, koncentraciji kisika, pH i temperaturi. Nadalje, pokazalo se kako je INT test osjetljivija metoda za dokazivanje DHA od TTC testa. Stanice mikroorganizama permeabilnije su za INT, štoviše, INT je pokazao veći afinitet prema elektronima u odnosu na TTC (Gong, 1997).



Slika 4. Mehanizam prikazuje ulogu dehidrogenaze u redukciji trifenil tetrazolijum klorida (TTC) u trifenil formazan (TTF) (prilagođeno prema Burdock i sur., 2011).

1.4 Cilj istraživanja

Cilj istraživanja bio je odrediti utjecaj gujavice *Eisenia fetida* na aktivnost mikrobne dehidrogenaze u tlu tijekom šestomjesečne inkubacije mikrokozmosa sterilnog i nesterilnog tla. Također se nastojala odrediti aktivnost iste u sadržaju probavila gujavica tijekom šestomjesečne inkubacije mikrokozmosa sterilnog i nesterilnog tla. U skladu s promjenama enzimske aktivnosti, očekivala se i promjena vrijednosti rezultata provedenih fizikalnih i kemijskih analiza tla.

2 MATERIJALI I METODE

2.1 Pribor i uređaji

Prilikom provođenja eksperimenta korišteni su navedeni pribor i uređaji:

- analitička vaga, *Mettler AB54*
- autoklav, *Melag*
- Centrifuga *HERMLE Z 233 MK-Z*
- Inkubator *Sutjeska*
- kvarcne kivete
- mini- laboratorij, *Multi340i/ Set WTW*
- Mufolna peć, *Nabertherm*
- plastične epice, 2000 µL, *Eppendorf*
- plastične kantice, 1 L
- podesiva mikropipeta, 1000 µL, *Eppendorf*
- porculanski lončići
- UV-VIS spektrofotometar, *Coleman 572*, *Perkin- Elmer*
- stakleno laboratorijsko posuđe
- stolna vibracijska miješalica (vortex mixer)
- sušionik, *Instrumentaria ST*- 01/02

2.2 Modelni organizmi

Prilikom izrade eksperimenta, kao modelni organizmi, korištene su gujavice *Eisenia fetida*. Sistematske kategorije navedenog organizma prikazane su u tablici 1. Gujavice (slika 5) su nabavljane iz uzgoja GOGO ribolov iz Belog Manastira, a potom su aklimatizirane. Aklimatizacija je provedena u plastičnim kanticama (1 L) koje su se nalazile u sterilizatoru 12 dana na temperaturi od 20 °C. Kantice su sadržavale nesterilno tlo, u koje je nakon 7 dana dodan konjski stajnjak uzet na osječkom hipodromu Pampas.

Tablica 1. Sistematske kategorije modelnog organizma (web 4)

Carstvo:	Animalia
Koljeno:	Annelida
Razred:	Oligochaeta
Red:	Opisthopora
Porodica:	Lumbricidae
Rod:	*Eisenia*
Vrsta:	*Eisenia fetida*



Slika 5. Gujavice vrste *Eisenia Fetida*, umjetan uzgoj (web 5).

Navedena vrsta je najšire korištena vrsta u umjetnom uzgoju. Komercijalno se koristi za proizvodnju komposta u poljoprivredne svrhe. S obzirom na temeperaturu i vlagu, široke je ekološke valencije. Brze je stope rasta (približno 70 dana). Odrasla jedinka može doseći do 1500 mg tjelesne mase. U prosjeku proizvede jedan kokon svaki treći dan, iz kojih izlaze jedno do tri mladih nakon inkubacije do četiri tjedna (Siddique i sur. 2005).

2.3 Priprema mikrokozmosa

Eksperiment je proveden u periodu od 6 mjeseci, od kolovoza do veljače 2013./2014. godine. Uzorci tla černozema uzeti su u šumi Haljevo (Osječko-baranjska županija). Tlo je usitnjeno gnječenjem do 5 mm, a potom je dio tla autoklavirano (121 °C, 1 bar). U plastične kantice (1 L) stavljeno je tlo, prethodno navlaženo sterilnom destiliranom vodom. Tako je formirano 20 mikrokozmosa, podijeljena u četiri tipa: Sterilno tlo bez gujavica (autoklavirano tlo), nesterilno tlo bez gujavica, sterilno s gujavicama i nesterilno tlo s gujavicama. U svaku kanticu koja je predstavljala tip s gujavicama, stavljeno je pet gujavica koje su prethodno bile izvagane i aklimatizirane. Kantice su držane u inkubatoru pri 20 °C. Svaka četiri tjedna uzrokovano je tlo i sadržaj probavila gujavica, nakon čega su iste bile izvagane i zamijenjene drugim gujavicama po istom postupku.

2.4 Fizikalno-kemijske analize tla

Analize fizikalno-kemijskih svojstva tla obuhvatile su određivanje mase suhe tvari u tlu te mase pepela i organske tvari u tlu. Također je analizirana i pH reakcija i električni konduktivitet tla.

2.4.1 Određivanje mase suhe tvari u tlu

Masa suhe tvari (kruta tvar) u uzorcima tla određena je sušenjem 1 g svježeg tla u sušioniku na 100 °C u trajanju od 24 h (slika 6).



Slika 6. Određivanje mase suhe tvari, sušionik (autorska fotografija).

2.4.2 Određivanje mase pepela i organske tvari u tlu

Masa pepela i organske tvari određeni su žarenjem na 360 °C u trajanju od 3:05 h u Mufolnoj peći. Masa tla nakon žarenja predstavlja masu pepela (g), a masa organske tvari predstavlja razliku mase suhe tvari i mase tla nakon žarenja (g).

2.4.3 Određivanje pH reakcije otopine tla

Provedeno je elektrokemijsko mjerenje pH reakcije vodene otopine tla. Suspendirano je 10 g tla u 20 ml destilirane vode (omjer tlo:voda 1:5, prema Tiquia i Tam, 2000). Nakon 15 minuta uz pomoć mini laboratorija, Multi340i/ Set WTW (Wissenschaftlich-Technische Werkstätten, Weilheim, Njemačka), izmjerene su vrijednosti aktivnog aciditeta otopine tla.

2.4.4 Određivanje električnog konduktiviteta tla

Električni konduktivitet izmjeren je pomoću mini laboratorija, Multi340i/ Set WTW u vodenom ekstraktu tla. Suspendirano je 10 g tla u 50 ml destilirane vode (omjer tlo:voda 1:5) te je nakon 4 sata provedeno mjerenje.

2.5 Spektrofotometrijsko određivanje koncentracije formazana

Aktivnost dehidrogenaze ispitana je INT [2 (jod-fenil) -3 (nitro-fenil)-5 (fenil) tetrazol klorid)] testom. Test je modificirana metoda koja je nastala kombinacijom dviju metoda prema Benefield 1977 i Trevors 1984 (Masciandro i sur., 2000).

U sterilne, plastične epice odmjereno je 0,25 g tla iz svakog tipa mikrokozmosa. U svaku epicu dodano je 0,125 ml 0,04 % otopine INT-a i 0,25 ml (0,5 mol) TRIS (2-amino-2-hidroksimetil-propan-1,3-diol) pufera, pH vrijednosti 7,7. pH vrijednost pufera podešena je pomoću otopine HCl. Uzorci su inkubirani u tami, 24 h na 40 ºC (slika 7). Nakon inkubacije uzorcima je dodano 1,25 ml metanola, a potom su promućkani na vorteksu te stavljeni na inkubaciju u tami, pri sobnoj temperaturi u trajanju od 12 h. Nakon toga, uzorci su centrifugirani 10 min na 3000 x g. Potom je pomoću spektrofotometra izmjerena absorbancija supernatanta pri valnoj duljini od 480 nm u odnosu na slijepu probu. Time je određena koncentracija nastalog formazana (INTF) u uzorcima tla. Uzorci su replicirani 5 puta. Postupak je ponovljen sa sadržajem probavila gujavice (0,25 ml).

Aktivnost dehidrogenaze izražena je kao količina formazana nastalog u jedinici vremena po gramu suhog tla (mg g^{-1} h^{-1}). Prilikom izrade standarda, umjesto ispitivanih uzoraka, korištena je askorbinska kiselina (5 mM) te otopina INT-a, u rasponu koncentracija od 0,005 do 0,16%. Daljni postupak određivanja enzimske aktivnosti isti je kao i u ispitivanim uzorcima tla.



Slika 7. Inkubacija ispitivanih uzoraka (autorska fotografija).

2.6 Statistička obrada podataka

Podaci su obrađeni u programu Microsoft Office Excel 2007 pod Windows 7 operativnim sustavom. Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost ± standardna devijacija. Za grafički prikaz rezultata korišten je program KyPlot 2.0 beta 15 pod Windows 7 operativnim sustavom. Statističke analize rezultata obrađene su u programu SPSS Statistics 20 pod Windows 7 operativnim sustavom.

Za testiranje razlika između dobivenih rezultata (pH vrijednost i električni konduktivitet) korišten je test analize varijance s jednim promjenjivim faktorom (*one way – ANOVA*) te *post – hoc* test (Bonferoni test) ili test višestruke usporedbe koji nam govori koje razlike su „zaslužne“ za statistički značajan rezultat. Za testiranje razlika između rezultata preostalih parametara korišten je Kruskal-Wallis-ov test (neparametarski ekvivalent jednosmjernoj analizi varijance za nezavisne uzorke). Nulta hipoteza navedenih testova jest da je srednja vrijednost rangova uzoraka jednaka. Iz rezultata testa vidimo *p* vrijednost testa na osnovu koje potvrđujemo, odnosno odbacujemo nultu hipotezu. Ako je je *p* vrijednost manja od 0,05 odbacuje se nulta hipoteza i sa sigurnošću od 95% može se utvrditi da postoji statistički značajna razlika među uzorcima. Ako je *p* vrijednost testa veća od 0,05 može se tvrditi kako među ispitivanim uzorcima ne postoji statistički značajna razlika.

3 REZULTATI

3.1 Fizikalno- kemijske analize tla ispitivanih mikrokozmosa

Tijekom eksperimenta koji se provodio u periodu od 6 mjeseci, od kolovoza do veljače 2013./2014. godine izmjereni su sljedeći fizikalno- kemijski parametri: masa suhe tvari, pepela i organske tvari te pH i konduktivitet.

3.1.1 Masa suhe tvari

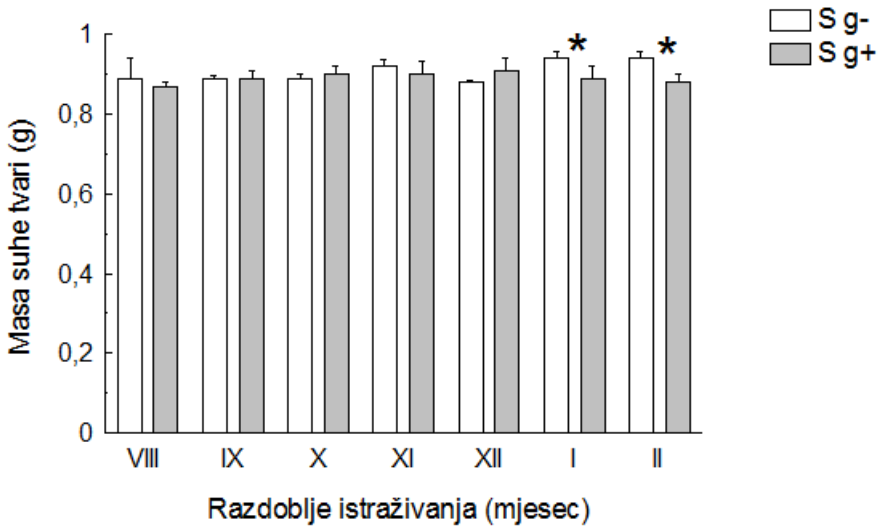
Tablica 2. prikazuje vrijednosti rezultata fizikalne analize ispitivanih uzoraka u razdoblju od kolovoza 2013. godine do veljače 2014. godine. Određena je masa suhe tvari (DW), pepela (AW) i organske tvari (AFDW). Prikazane vrijednosti predstavljaju srednju vrijednost izmjerenih parametara i standardnu devijaciju koja se nalazi u zagradi. Oznaka Sg- predstavlja sterilni tretman bez gujavica, Sg+ predstavlja sterilni tretman s gujavicama, NSg- nesterilni tretman bez gujavica i NSg+ predstavlja nesterilni tretman s gujavicama.

Tablica 2. Fizikalna svojstva ispitivanih uzoraka tla (g) (srednja vrijednost, (+/- SD)) u razdoblju od kolovoza 2013. do veljače 2014. godine.

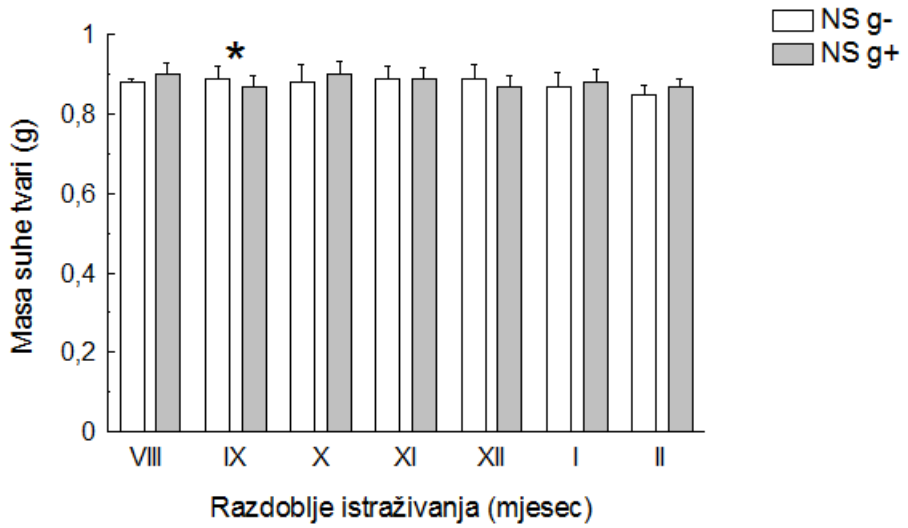
	S g^-			S g^+			NS g^-			NS g^+		
	DW	AW	AFDW	DW	AW	AFDW	DW	AW	AFDW	DW	AW	AFDW
Kolovoz	0,89 (0,051)	0,82 (0,045)	0,06 (0,004)	0,87 (0,014)	0,82 (0,045)	0,06 (0,004)	0,88 (0,010)	0,81 (0,018)	0,07 (0)	0,9 (0,027)	0,83 (0,018)	0,07 (0,028)
Ruajn	0,89 (0,008)	0,83 (0,007)	0,05 (0,004)	0,89 (0,022)	0,83 (0,023)	0,05 (0,006)	0,89 (0,032)	0,84 (0,026)	0,06 (0,015)	0,87 (0,027)	0,81 (0,018)	0,05 (0,028)
Listopad	0,89 (0,013)	0,83 (0,013)	0,06 (00,015)	0,9 (0,022)	0,86 (0,023)	0,05 (0,006)	0,88 (0,044)	0,84 (0,039)	0,04 (0,017)	0,9 (0,032)	0,83 (0,034)	0,06 (0,014)
Studeni	0,92 (0,016)	0,87 (0,019)	0,06 (0,007)	0,9 (0,031)	0,85 (0,030)	0,05 (0,005)	0,89 (0,032)	0,85 (0,026)	0,04 (0,015)	0,89 (0,027)	0,83 (0,018)	0,07 (0,028)
Prosinac	0,88 (0,005)	0,83 (0,006)	0,05 (0,002)	0,91 (0,034)	0,86 (0,031)	0,04 (0,004)	0,89 (0,037)	0,85 (0,025)	0,04 (0,020)	0,87 (0,027)	0,82 (0,018)	0,05 (0,028)
Siječanj	0,94 (0,017)	0,88 (0,016)	0,06 (0,006)	0,89 (0,034)	0,83 (0,031)	0,06 (0,004)	0,87 (0,037)	0,83 (0,025)	0,05 (,020)	0,88 (0,034)	0,82 (0,025)	0,06 (0,014)
Veljača	0,94 (0,015)	0,87 (0,016)	0,06 (0,009)	0,88 (0,019)	0,83 (0,022)	0,06 (0,004)	0,85 (0,026)	0,82 (0,028)	0,04 (0,004)	0,87 (0,022)	0,82 (0,019)	0,03 (0,012)

Srednja vrijednost suhe tvari kreće se u rasponu od 0,85 g (veljača, NSg-) do 0,94 g (siječanj i veljača, Sg-). Za sterilni tretman bez gujavica (Sg-) srednje vrijednosti se kreću od 0,88 g (prosinac) do 0,94 g (siječanj i veljača). Srednja vrijednost kod sterilnog tretmana s gujavicama (Sg+) kreće se od 0,87 g (kolovoz) do 0,91 g (prosinac). Kod nesterilnog tretmana bez gujavica (NSg-) srednja vrijednost se kreće od 0,85 g (veljača) do 0,89 g (rujan, studeni i prosinac), a kod nesterilnog tretmana s gujavicama (NSg+) od 0,87 g (rujan, prosinac i veljača) do 0,90 g (kolovoz i listopad). Grafički prikaz opisanih rezultata sadrži slika 8 i 9.

Statistička analiza rezultata pokazala je signifikantnu razliku između sterilnog tretmana bez gujavica i sterilnog s gujavicama (Sg- i Sg+) za siječanj i veljaču ($p<0,05$) (slika 8). Između nesterilnog tretmana bez gujavica i nesterilnog tretmana s gujavicama (NSg- i NSg+) signifikantna razlika ($p<0,05$) utvrđena je za rujan (slika 9). U sterilnom tretmanu bez gujavica vrijednosti u kolovozu i prosincu signifikantno se razlikuju od vrijednosti u studenom, siječnju i veljači ($p<0,05$). Vrijednosti u rujnu i listopadu signifikantno se razlikuju od onih u siječnju i veljači ($p<0,05$). Vrijednosti unutar ostalih tretmana ne razlikuju se značajno kroz period inkubacije.



Slika 8. Grafički prikaz mase suhe tvari (g) sterilnih tretmana, bez gujavica (Sg-) i s gujavicama (Sg+), prikazane kao srednja vrijednost s pripadajućom standardnom devijacijom (vrijednosti označene zvjezdicom predstavljaju signifikantnu razliku između tretmana).

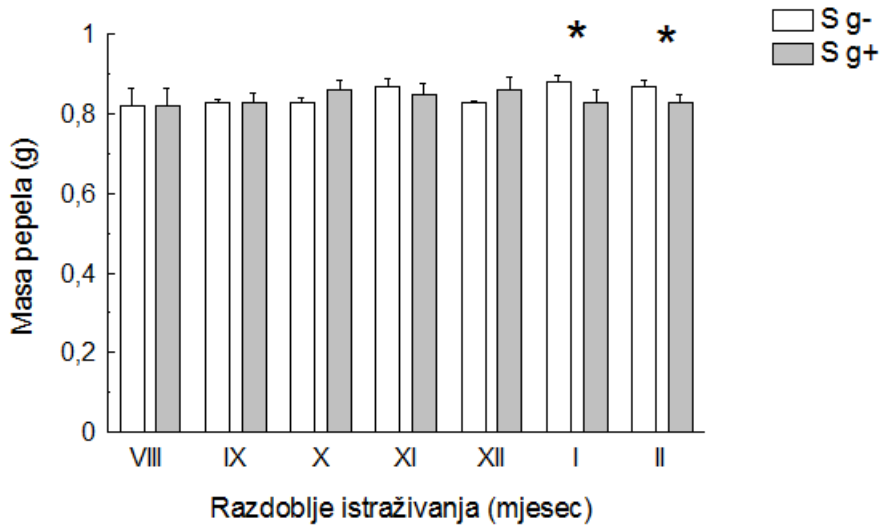


Slika 9. Grafički prikaz mase suhe tvari (g) nesterilnih tretmana, bez gujavica (NSg-) i s gujavicama (NSg+), prikazane kao srednja vrijednost s pripadajućom standardnom devijacijom (vrijednosti označene zvjezdicom predstavljaju signifikantnu razliku između tretmana).

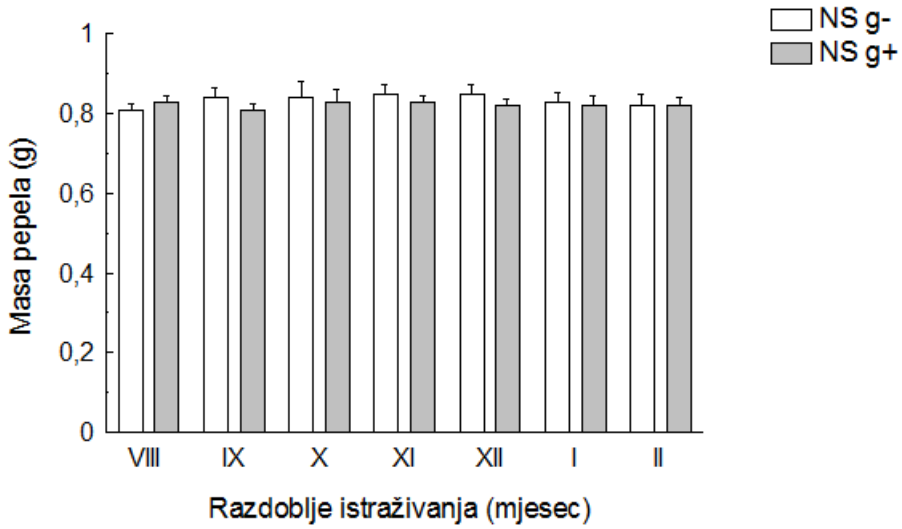
3.1.2 Masa pepela

Srednja vrijednost mase pepela u ispitivanim tretmanima kreće se u rasponu od 0,81 g (rujan, NSg+ i kolovoz NSg-) do 0,88 g (siječanj, Sg-). U sterilnom tretmanu bez gujavica srednje vrijednosti se kreću od 0,82 g (kolovoz) do 0,88 g (siječanj). U sterilnom tretmanu s gujavicama od 0,82 g (kolovoz) do 0,86 g (prosinac), u nesterilnom tretmanu bez gujavica od 0,81 g (kolovoz) do 0,85 g (studeni i prosinac), u nesterilnom tretmanu s gujavicama od 0,81 g (rujan) do 0,83 g (kolovoz, listopad i studeni). Grafički prikaz opisanih rezultata sadrže slike 10 i 11.

Statistička analiza pokazala je značajne razlike između sterilnog tretmana bez gujavica i sterilnog s gujavicama (Sg- i Sg+) ($p<0,05$) za siječanj i veljaču (slika 10). Između nesterilnog tretmana bez gujavica i nesterilnog tretmana s gujavicama (NSg- i NSg+) nije utvrđena signifikantna razlika. U sterilnom tretmanu bez gujavica vrijednosti u kolovozu, rujnu i listopadu signifikantno se razlikuju od vrijednosti u studenom, siječnju i veljači ($p<0,05$). Vrijednosti u prosincu signifikantno se razlikuju od onih u siječnju i veljači ($p<0,05$). Vrijednosti unutar ostalih tretmana ne razlikuju se značajno kroz period inkubacije.



Slika 10. Grafički prikaz mase pepela (g) sterilnih tretmana, bez gujavica (Sg-) i s gujavicama (Sg+), prikazane kao srednja vrijednost s pripadajućom standardnom devijacijom (vrijednosti označene zvjezdicom predstavljaju signifikantnu razliku između tretmana).

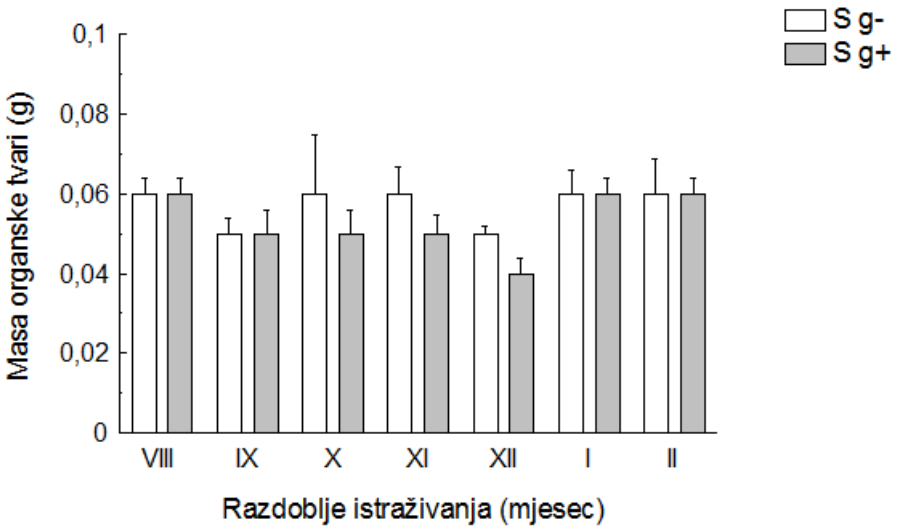


Slika 11. Grafički prikaz mase pepela (g) nesterilnih tretmana, bez gujavica (NSg-) i s gujavicama (NSg+), prikazane kao srednja vrijednost s pripadajućom standardnom devijacijom.

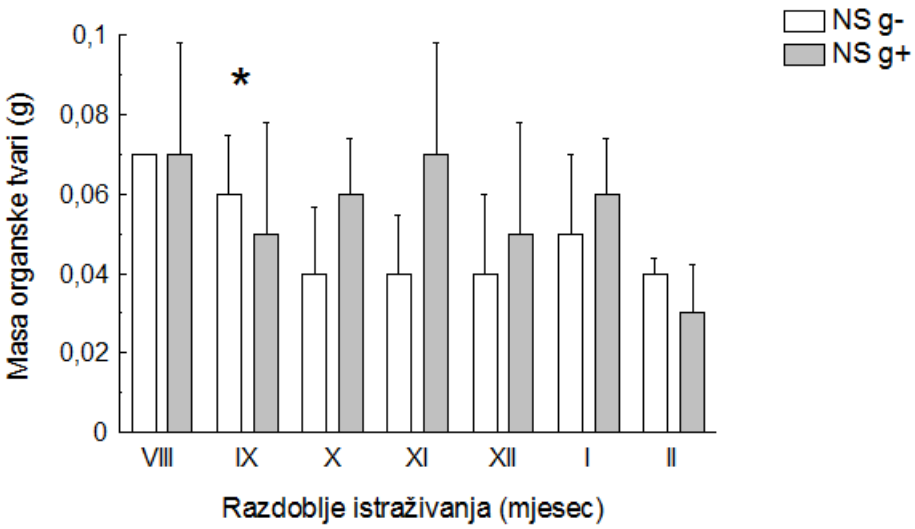
3.1.3 Masa organske tvari

Masa organske tvari u tlu ispitivanih tretmana zabilježen je u rasponu srednje vrijednosti od 0,03 g (veljača, NSg+) do 0,07 g (kolovoz i studeni, NSg+ i kolovoz NSg-). Srednja vrijednost mase organske tvari u sterilnom tretmanu bez gujavica kreće se od 0,05 g (rujan i prosinac) do 0,6 g (preostali mjeseci), u sterilnom tretmanu s gujavicama od 0,04 g (prosinac) do 0,06 g (kolovoz, siječanj i veljača), u nesterilnom tretmanu bez gujavica od 0,04 g (listopad, studeni, prosinac i veljača) do 0,07 g (kolovoz), u nesterilnom tretmanu s gujavicama od 0,03 g (veljača) do 0,07 g (kolovoz i studeni). Rezultati su grafički opisani na slikama 12 i 13.

Između sterilnog tretmana bez gujavica i sterilnog s gujavicama (Sg- i Sg+) nije utvrđena statistički značajna razlika. Između nesterilnog tretmana bez gujavica i nesterilnog tretmana s gujavicama (NSg- i NSg+) signifikantna razlika je utvrđena za rujan ($p<0,05$) (slika 13). Vrijednosti sterilnog tretmana bez gujavica ne razlikuju se statistički značajno kroz period inkubacije. U sterilnom tretmanu s gujavicama vrijednosti u rujnu signifikantno se razlikuju od vrijednosti u kolovozu i siječnju ($p<0,05$). Vrijednosti u listopadu i prosincu signifikantno se razlikuju od vrijednosti u kolovozu, siječnju i veljači ($p<0,05$), dok se vrijednosti u studenom signifikantno razlikuju od vrijednosti u kolovozu ($p<0,05$). U nesterilnom tretmanu bez gujavica vrijednosti u kolovozu signifikantno se razlikuju od vrijednosti u listopadu, studenom, prosincu, siječnju i veljači ($p<0,05$), a vrijednosti u rujnu signifikantno se razlikuju od vrijednosti u studenom, prosincu i veljači ($p<0,05$). Vrijednosti u siječnju signifikantno se razlikuju od vrijednosti u veljači ($p<0,05$). U nesterilnom tretmanu s gujavicama vrijednosti u kolovozu i siječnju signifikantno se razlikuju od vrijednosti u veljači i rujnu ($p<0,05$). Vrijednosti u studenom i listopadu signifikantno se razlikuju od vrijednosti u veljači ($p<0,05$). Vrijednosti u prosincu signifikantno se razlikuju od vrijednosti u kolovozu ($p<0,05$).



Slika 12. Grafički prikaz mase organske tvari (g) sterilnih tretmana, bez gujavica (Sg-) i s gujavicama (Sg+), prikazane kao srednja vrijednost s pripadajućom standardnom devijacijom.



Slika 13. Grafički prikaz mase organske tvari (g) nesterilnih tretmana, bez gujavica (NSg-) i s gujavicama (NSg+), prikazane kao srednja vrijednost s pripadajućom standardnom devijacijom (vrijednosti označene zvjezdicom predstavljaju signifikantnu razliku između tretmana).

3.1.4 pH reakcija tla

Vrijednosti koncentracije vodikovih (H^+) iona u otopini tla (pH) prikazane su u tablici 3. Rezultati su prikazani u obliku srednjih vrijednosti i standardne devijacije koja se nalazi u zagradi.

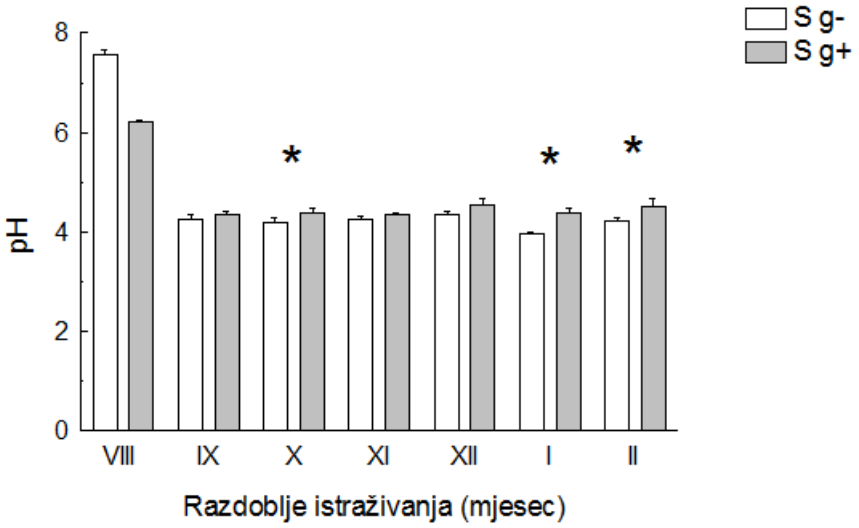
Tablica 3. Kemijska svojstva ispitivanih uzoraka (srednja vrijednost, (+/-SD)) u razdoblju od kolovoza 2013. do veljače 2014. godine.

	S g^-		S g^+		NS g^-		NS g^+	
	pH	æ	pH	æ	pH	æ	pH	æ
Kolovoz	7,56 (0,104)	179,44 (9,528)	6,22 (0,039)	165,17 (6,335)	7,46 (0,052)	184,37 (7,816)	6,98 (0,077)	161,91 (11,393)
Ruajn	4,26 (0,109)	161,06 (10,719)	4,34 (0,054)	157,67 (21,547)	4,02 (0,026)	190,95 (8,448)	4,16 (0,077)	189,42 (11,393)
Listopad	4,19 (0,089)	238,69 (7,305)	4,37 (0,088)	242,42 (15,688)	4,05 (0,05)	305,2 (15,017)	4,07 (0,07)	255,18 (11,435)
Studeni	4,24 (0,066)	231,31 (14,176)	4,35 (0,018)	290,54 (24,466)	4,03 (0,048)	278,97 (5,752)	3,97 (0,085)	292,38 (6,064)
Prosinac	4,35 (0,065)	168,35 (10,541)	4,53 (0,131)	228,44 (8,289)	4,36 (0,018)	231,14 (10,71)	4,14 (0,084)	273,53 (9,941)
Siječanj	3,97 (0,029)	232,58 (3,865)	4,37 (0,084)	257,16 (23,165)	3,84 (0,064)	287,82 (14,34)	4,1 (0,044)	308,94 (12,505)
Veljača	4,23 (0,055)	249,95 (16,722)	4,49 (0,168)	182,89 (36,437)	3,99 (0,094)	302,84 (12,819)	3,98 (0,042)	369,89 (19,466)

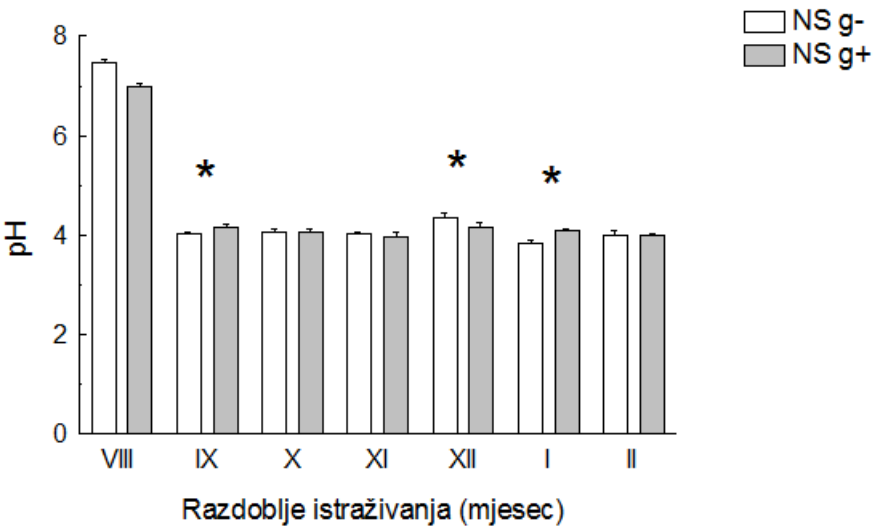
Srednja vrijednost koncentracije vodikovih (H^+) iona u otopini tla kretala se u rasponu od 3,97 (siječanj, Sg- i studeni, NSg+) do 7,56 (kolovoz, Sg-) što prikazuje slika 11. Srednja vrijednost koncentracije vodikovih iona u sterilnom tretmanu bez gujavica kretala se od 3,97 (siječanj) do 7,56 (kolovoz), u sterilnom tretmanu s gujavicama od 4,34 (rujan) do 6,22 (kolovoz), u nesterilnom tretmanu bez gujavica od 3,84 (siječanj) do 7,46 (kolovoz), a u nesterilnom tretmanu s gujavicama od 3,97 (studeni) do 6,98 (kolovoz). Najviše vrijednosti za sva četiri tretmana izmjerene su u kolovozu, što je posljedica korištenja neispravne elektrode za mjerenje pH te se navedene vrijednosti nisu uzimale u obzir prilikom statističke obrade. Grafički prikaz rezultata sadrže slike 14 i 15.

Signifikantna razlika ($p<0,05$) između sterilnog tretmana bez gujavica i sterilnog s gujavicama (Sg- i Sg+) utvrđena je za listopad, siječanj i veljaču (slika 14). Između nesterilnog tretmana bez gujavica i nesterilnog tretmana s gujavicama (NSg- i NSg+) signifikantna razlika ($p<0,05$) utvrđena je za rujan, prosinac i siječanj (slika 15). U sterilnom tretmanu bez gujavica izmjerene pH vrijednosti u rujnu, listopadu, studenom, prosincu i veljači signifikantno se razlikuju od vrijednosti u siječnju ($p<0,05$). U sterilnom tretmanu s

gujavicama nema signifikantnih razlika između vrijednosti kroz period inkubacije. U nesterilnom tretmanu bez gujavica vrijednosti u rujnu, listopadu, studenom, i veljači signifikantno se razlikuju od vrijednosti u prosincu i siječnju ($p<0,05$). Vrijednosti u prosincu razlikuju se od vrijednosti u siječnju ($p<0,05$). U nesterilnom tretmanu s gujavicama vrijednosti u rujnu i prosincu signifikantno se razlikuju od vrijednosti u studenom i veljači ($p<0,05$).



Slika 14. Grafički prikaz koncentracije vodikovih (H^+) iona sterilnih tretmana, bez gujavica (Sg-) i s gujavicama (Sg+), prikazane kao srednja vrijednost s pripadajućom standardnom devijacijom (vrijednosti označene zvjezdicom predstavljaju signifikantnu razliku između tretmana).



Slika 15. Grafički prikaz koncentracije vodikovih (H^+) iona nesterilnih tretmana, bez gujavica (NSg-) i s gujavicama (NSg+), prikazane kao srednja vrijednost s pripadajućom standardnom devijacijom (vrijednosti označene zvjezdicom predstavljaju signifikantnu razliku između tretmana).

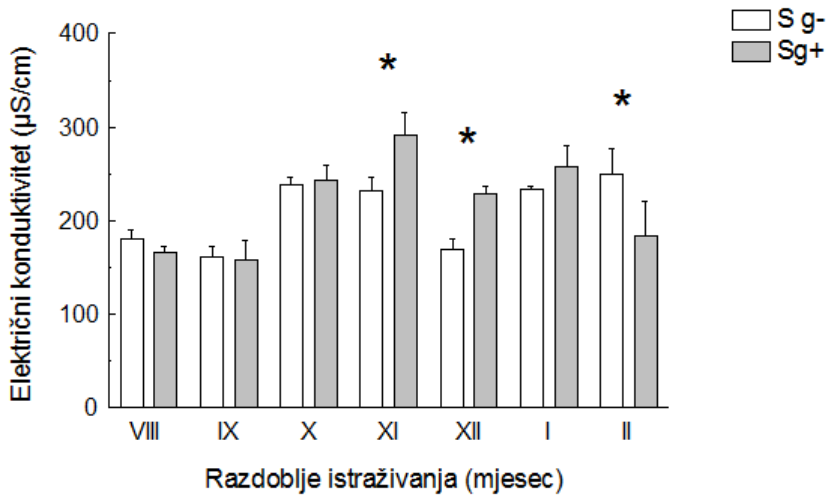
3.1.5 Električni konduktivitet tla

Vrijednost električnog konduktiviteta ekstrakta tla prikazane su u tablici 3. Rezultati su prikazani u obliku srednjih vrijednosti i standardne devijacije koja se nalazi u zagradi.

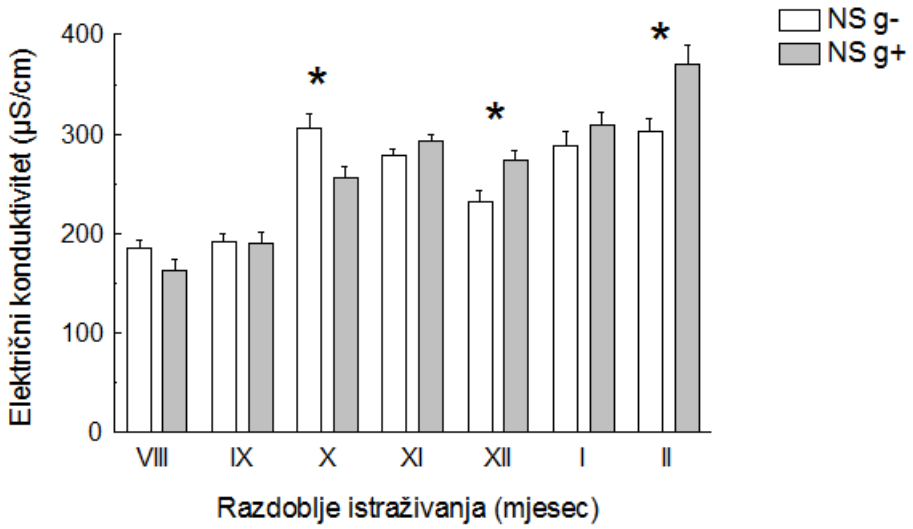
Raspon vrijednosti električnog konduktiviteta može se vidjeti na slikama 16 i 17. Srednje vrijednosti se kreću u rasponu od 158 µS/cm (rujan, Sg+) do 369,89 µS/cm (veljača, NSg+). U sterilnom tretmanu bez gujavica srednje vrijednosti se kreću od 161,06 µS/cm (rujan) do 249,95 µS/cm (veljača), u sterilnom tretmanu s gujavicama od 157,67 µS/cm (rujan) do 290,54 µS/cm (studeni), u nesterilnom tretmanu bez gujavica od 184,37 µS/cm (kolovoz) do 305,20 µS/cm (listopad) te u nesterilnom tretmanu s gujavicama od 161,91 µS/cm (kolovoz) do 369,89 µS/cm (veljača).

Signifikantna razlika ($p<0,05$) između sterilnog tretmana bez gujavica i sterilnog s gujavicama (Sg- i Sg+) utvrđena je za studeni, prosinac i veljaču (slika 16). Između nesterilnog tretmana bez gujavica i nesterilnog tretmana s gujavicama (NSg- i NSg+) signifikantna razlika ($p<0,05$) utvrđena je za listopad, prosinac i veljaču (slika 17). U

sterilnom tretmanu bez gujavica izmjerene vrijednosti u kolovozu, rujnu i prosincu signifikantno se razlikuju od vrijednosti u listopadu, studenom, siječnju i veljači ($p<0,05$). U sterilnom tretmanu s gujavicama vrijednosti u kolovozu signifikantno se razlikuju od vrijednosti u listopadu, prosincu, siječnju i veljači ($p<0,05$). Vrijednosti u rujnu signifikantno se razlikuju od vrijednosti u listopadu, studenom, prosincu i siječnju ($p<0,05$). Vrijednosti u listopadu razlikuju se od vrijednosti u studenom i veljači ($p<0,05$). Vrijednosti u studenom, razlikuju se od vrijednosti u prosincu i veljači($p<0,05$). Vrijednosti u siječnju razlikuju se od vrijednosti u veljači ($p<0,05$). U nesterilnom tretmanu bez gujavica vrijednosti u kolovozu i rujnu signifikantno se razlikuju od vrijednosti u listopadu, studenom, prosincu, siječnju i veljači ($p<0,05$). Vrijednosti u listopadu signifikantno se razlikuju od vrijednosti u studenom i prosincu ($p<0,05$). Vrijednosti u prosincu signifikantno se razlikuju od vrijednosti u studenom, siječnju i veljači ($p<0,005$). U nesterilnom tretmanu s gujavicama vrijednosti u kolovozu i rujnu signifikantno se razlikuju od vrijednosti u listopadu, studenom, prosincu, siječnju i veljači ($p<0,05$). Vrijednosti u listopadu signifikantno se razlikuju od vrijednosti u studenom, siječnju i veljači ($p<0,05$). Vrijednosti u studenom signifikantno se razlikuju od vrijednosti u veljači ($p<0,05$). Vrijednosti u prosincu signifikantno se razlikuju od vrijednosti u siječnju i veljači ($p<0,05$). Vrijednosti u siječnju signifikantno se razlikuju od vrijednosti u veljači ($p<0,05$).



Slika 16. Grafički prikaz električnog konduktiviteta (µS/cm) sterilnih tretmana, bez gujavica (Sg-) i s gujavicama (Sg+), prikazane kao srednja vrijednost s pripadajućom standardnom devijacijom (vrijednosti označene zvjezdicom predstavljaju signifikantnu razliku između tretmana).



Slika 17. Grafički prikaz električnog konduktiviteta (µS/cm) nesterilnih tretmana, bez gujavica (NSg-) i s gujavicama (NSg+), prikazane kao srednja vrijednost s pripadajućom standardnom devijacijom (vrijednosti označene zvjezdicom predstavljaju signifikantnu razliku između tretmana).

3.2 Količina nastalog formazana

3.2.1 Količina nastalog formazana u uzorcima tla

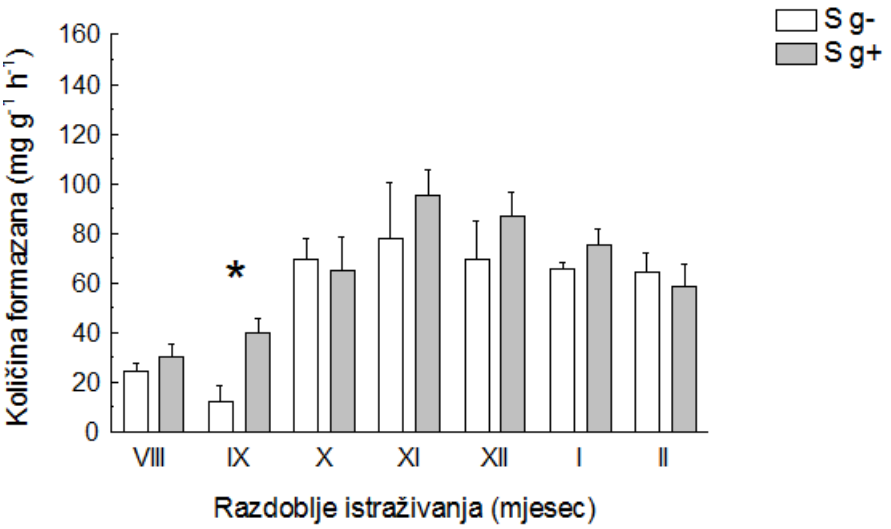
Količina nastalog jodonitrotetrazolij-formazana (INTF) u uzorcima tla prikazana je na tablici 4 u obliku srednjih vrijednosti i standardne devijacije koja se nalazi u zagradi. Srednje vrijednosti kretale su se u rasponu od 12,46 mg g^{-1} h^{-1} (rujan, Sg-) do 144,83 mg g^{-1} h^{-1} (studeni, NSg+). Raspon koncentracije INTF-a u razdoblju istraživanja za ispitivane tretmane prikazuju slike 18 i 19. U sterilnom tretmanu bez gujavica srednje vrijednosti se kreću od 12,46 mg g^{-1} h^{-1} (rujan) do 77,88 mg g^{-1} h^{-1} (studeni). U sterilnom tretmanu s gujavicama od 30,1 mg g^{-1} h^{-1} (kolovoz) do 94,98 mg g^{-1} h^{-1} (studeni). U nesterilnom tretmanu bez gujavica od 36,44 mg g^{-1} h^{-1} (kolovoz) do 82,65 mg g^{-1} h^{-1} (studeni) dok se u nesterilnom tretmanu s gujavicama kreću od 30,73 mg g^{-1} h^{-1} (kolovoz) do 144,83 mg g^{-1} h^{-1} (studeni).Tablica 4.

Tablica 4. Količina nastalog INTF u uzorcima tla (mg g^{-1} h^{-1}) (srednja vrijednost, (+/- SD)) u razdoblju od kolovoza 2013. do veljače 2014. godine.

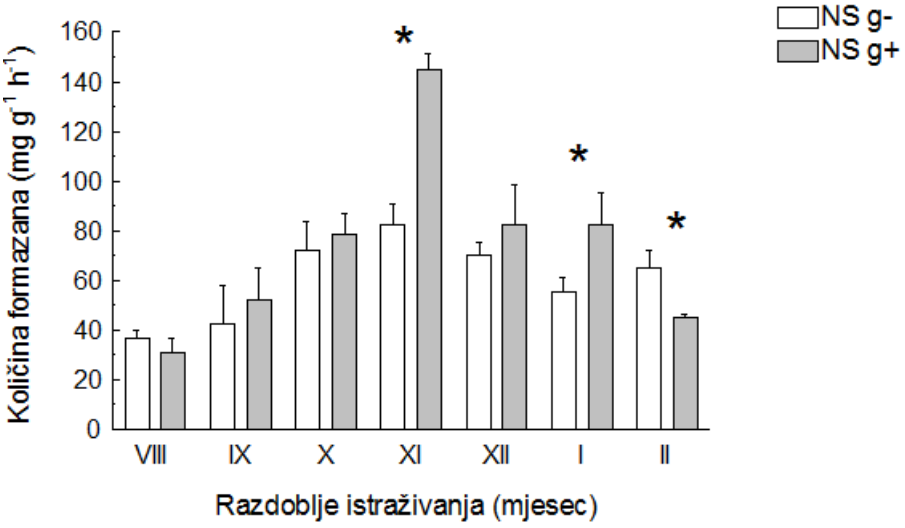
	S g^-	S g^+	NS g^-	NS g^+
Kolovoz	24,69 (3,28)	30,1 (5,2)	36,44 (3,15)	30,73 (5,58)
Rujan	12,46 (6,26)	39,76 (5,75)	42,37 (15,68)	52,11 (12,75)
Listopad	69,26 (8,3)	64,77 (13,80)	71,84 (11,39)	78,68 (8,12)
Studeni	77,88 (22,23)	94,98 (10,41)	82,65 (8,17)	144,83 (6,69)
Prosinac	69,37 (15,45)	86,65 (9,78)	70 (4,89)	82,33 (15,99)
Siječanj	65,69 (2,68)	75,12 (6,75)	55,34 (5,52)	82,33 (12,93)
Veljača	64,35 (8,02)	58,57 (9,01)	65,05 (6,82)	45,22 (1,17)

Između sterilnog tretmana bez gujavica i sterilnog s gujavicama (Sg- i Sg+) signifikantna razlika utvrđena je za rujan ($p<0,05$) (slika 18). Između nesterilnog tretmana bez gujavica i nesterilnog tretmana s gujavicama (NSg- i NSg+) signifikantna razlika utvrđena je za studeni, siječanj i veljaču ($p<0,05$) (slika 19).

U sterilnom tretmanu bez gujavica vrijednosti u kolovozu i rujnu signifikantno se razlikuju od vrijednosti u listopadu, studenom, prosincu, siječnju i veljači ($p<0,05$). U sterilnom tretmanu s gujavicama vrijednosti u kolovozu signifikantno se razlikuju od vrijednosti u listopadu, studenom, prosincu i siječnju ($p<0,05$). Vrijednosti u rujnu signifikantno se razlikuju od vrijednosti u studenom, prosincu i siječnju ($p<0,05$).Vrijednosti u studenom signifikantno se razlikuju s vrijednosti u listopadu i veljači, a vrijednosti u prosincu od vrijednosti u veljači ($p<0,05$). U nesterilnom tretmanu bez gujavica vrijednosti u kolovozu i rujnu signifikantno se razlikuju od vrijednosti u listopadu, studenom, prosincu i veljači ($p<0,05$). Vrijednosti u listopadu i studenom signifikantno se razlikuju od vrijednosti u siječnju ($p<0,05$). U nesterilnom tretmanu s gujavicama vrijednosti u kolovozu signifikantno se razlikuju od vrijednosti u listopadu, studenom, prosincu i siječnju ($p<0,05$). Vrijednosti u rujnu signifikantno se razlikuju od vrijednosti u studenom ($p<0,05$). Vrijednosti u studenom, prosincu i siječnju signifikantno se razlikuju od vrijednosti u veljači ($p<0,05$).



Slika 18. Grafički prikaz količine nastalog formazana u tlu (mg g^{-1} h^{-1}) sterilnih tretmana, bez gujavica (Sg-) i s gujavicama (Sg+), prikazane kao srednja vrijednost s pripadajućom standardnom devijacijom (vrijednosti označene zvjezdicom predstavljaju signifikantnu razliku između tretmana).



Slika 19. Grafički prikaz količine nastalog formazana u tlu (mg g^{-1} h^{-1}) nesterilnih tretmana, bez gujavica (NSg-) i s gujavicama (NSg+), prikazane kao srednja vrijednost s pripadajućom standardnom devijacijom (vrijednosti označene zvjezdicom predstavljaju signifikantnu razliku između tretmana).

3.2.2 Količina nastalog formazana u sadržaju probavila gujavice

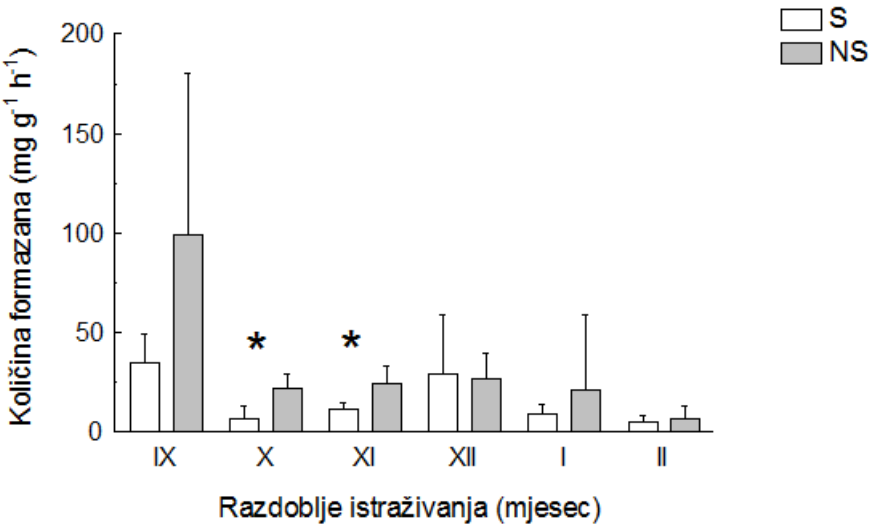
Srednje vrijednosti izmjerene količine jodonitrotetrazolij-formazana (INTF) u uzorcima sadržaja probavila gujavice prikazane su u tablici 5. Mjerenje u kolovozu nije provedeno jer gujavice prethodno nisu bile izložene tretmanima.

Tablica 5. Količina nastalog INTF u uzorcima sadržaja probavila gujavica (mg g^{-1} h^{-1}) (srednja vrijednost, (+/- SD)) u razdoblju od kolovoza 2013. do veljače 2014. godine.

	S g+	NS g+
Kolovoz	-	-
Rujan	34,38 (14,56)	98,79 (80,99)
Listopad	6,66 (6,24)	21,39 (7,07)
Studeni	11,04 (3,26)	23,82 (8,55)
Prosinac	29,04 (29,94)	26,61 (12,70)
Siječanj	8,99 (4,77)	20,75 (37,66)
Veljača	4,56 (3,18)	6,49 (6,23)

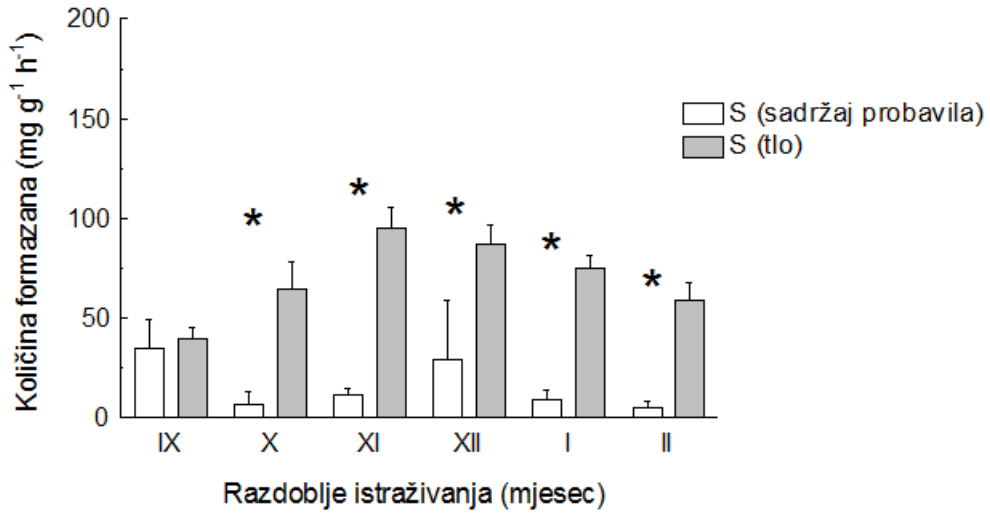
Količina izmjerenog INTF-a kretala se u rasponu od 4,56 mg g^{-1} h^{-1} (veljača, sterilno tlo) do 98,79 mg g^{-1} h^{-1} (rujan, nesterilno tlo). U sterilnom tretmanu srednje vrijednosti su se kretale od 4,56 mg g^{-1} h^{-1} (veljača) do 34,88 mg g^{-1} h^{-1} (rujan). U nesterilnom tretmanu vrijednosti su se kretale od 6,49 mg g^{-1} h^{-1} (veljača) do 98,79 mg g^{-1} h^{-1} (rujan). Raspon koncentracije INTF-a u razdoblju istraživanja za ispitivane tretmane prikazuje slika 20.

Između sterilnog i nesterilnog tretmana signifikantna razlika ($p<0,05$) utvrđena je za listopad i studeni (slika 20). Vrijednosti sterilnog tretmana u rujnu, studenom i prosincu signifikantno se razlikuju od vrijednosti u veljači, a vrijednosti u listopadu signifikantno se razlikuju od vrijednosti u rujnu ($p<0,05$). Vrijednosti nesterilnog tretmana u rujnu, studenom i prosincu signifikantno se razlikuju od vrijednosti u veljači, a vrijednosti u siječnju signifikantno se razlikuju od vrijednosti u rujnu ($p<0,05$).

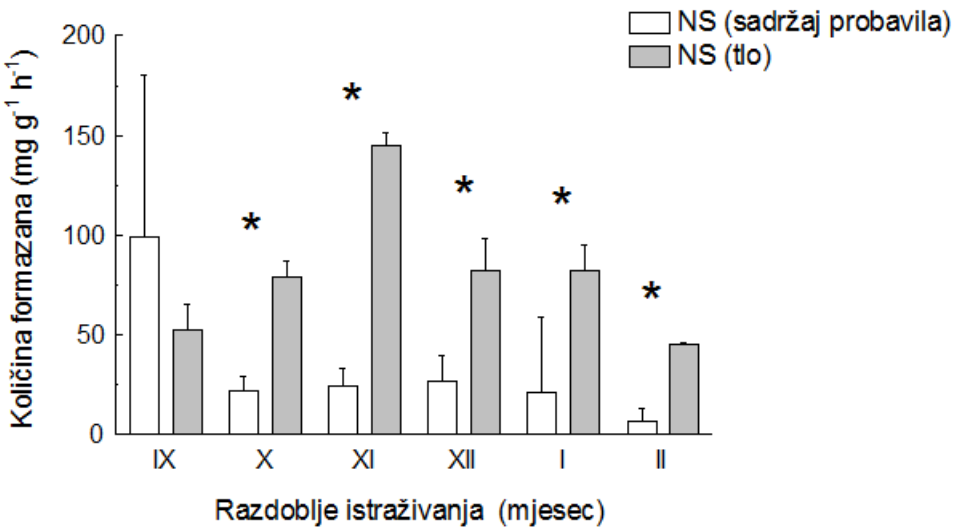


Slika 20. Grafički prikaz količine nastalog formazana u sadržaju probavila gujavica (mg g^{-1} h^{-1}) sterilnog (S) i nesterilnog (NS) tretmana, prikazane kao srednja vrijednost s pripadajućom standardnom devijacijom (vrijednosti označene zvjezdicom predstavljaju signifikantnu razliku između tretmana).

Količina nastalog formazana u sadržaju probavila gujavice sterilnih tretmana signifikantno se razlikuje od količine formazana u tlu ($p<0,05$) u svim mjesecima istraživanja osim u rujnu (slika 21). Količina nastalog formazana u sadržaju probavila gujavice nesterilnih tretmana signifikantno se razlikuje od količine formazana u tlu ($p<0,05$) u svim mjesecima istraživanja osim u rujnu i veljači (slika 22).



Slika 21. Grafički prikaz količine nastalog formazana (mg g^{-1} h^{-1}) sterilnih tretmana u sadržaju probavila gujavica i u tlu, prikazane kao srednja vrijednost s pripadajućom standardnom devijacijom (vrijednosti označene zvjezdicom predstavljaju signifikantnu razliku između uzoraka).



Slika 22. Grafički prikaz količine nastalog formazana (mg g^{-1} h^{-1}) sterilnih tretmana u sadržaju probavila gujavica i u tlu, prikazane kao srednja vrijednost s pripadajućom standardnom devijacijom (vrijednosti označene zvjezdicom predstavljaju signifikantnu razliku između uzoraka).

4 RASPRAVA

Gujavice utječu na razgradnju organske tvari, izravno, hraneći se organskim ostacima i neizravno kroz interakciju s mikroorganizmima, stimulirajući ili inhibirajući njihovu aktivnost (Aira i sur., 2007). Literaturni podaci pokazuju kako aktivnost gujavica znatno pospješuje razgradnju organske tvari te potiče proces mineralizacije i humifikacije (Parmelee i sur., 1990), u skladu s tim utječu na porast udjela suhe tvari i pepela u tlu. Rezultati ovog istraživanja pokazali su kako sterilni tretman bez gujavica ima signifikantno veću masu suhe tvari i pepela u siječnju i veljači nego tretman s gujavicama dok se razlika u masi organske tvari nije utvrdila. U nesterilnom tretmanu razlika je utvrđena samo za rujan, gdje tretman s gujavicama mjeri manju vrijednost mase suhe ali i organske tvari što nije u skladu s gore navedenim literaturnim podacima. Razlog tomu može biti aklimatizacija gujavica (nesterilno tlo s konjskim stajnjakom) gdje je putem probave svaki mjesec u tretmane unošena organska tvar te nije vidljiva moguća promjena organske tvari u tretmanima.
Organska tvar u tlu značajno utječe na aktivnost enzima u tlu (Wolinska i Stepnievska, 2012). Dokazano je kako je enzimska aktivnost u tlu povezana s organskom tvari u tlu. Viša razina organske tvari u tlu osigurava dovoljno supstrata koji osiguravaju višu mikrobnu masu stoga i veću proizvodnju enzima (Yuan i Yue, 2012). Međutim, u ovom radu nije utvrđena tendencija porasta organske tvari sukladno s porastom aktivnosti dehidrogenaze.

Reakcija tla određena je omjerom koncentracije vodikovih (H^+) i hidroksilnih (OH^-) iona. Kisela tla imaju raspon pH vrijednosti ispod 7, dok su alkalna tla pH vrijednosti iznad 7. Za heterogeni sustav kao što je tlo, pH vrijednost između 6,5 i 7,5 smatra se neutralnim (Osman, 2013). Temeljem rezultata kemijske analize reakcije tla vidljivo je kako je tlo ispitivanih tretmana kiselo što je u skladu s podacima koji govore kako se pH vrijednost šumskog tla kreće u rasponu od 4 do 6 (Osman, 2013). pH regulira brojnost i aktivnost mikroorganizama u tlu te tako utječe na brzinu razgradnje organske tvari i dostupnost nutrijenata. Većina bakterija u terestrijalnom ekosistemu aktivna je u rasponu vrijednosti pH od 4 do 9. Aktinomicete preferiraju neutralne do blago alkalne uvjete (pH 6 do 8) dok se gljivice i cijanobakterije razvijaju pri blago kiselim uvjetima (pH 4 do 6) (Whalen i Sampedro, 2010). pH vrijednost u istraživanim tretmanima pruža uvjete za razvoj bakterija, gljivica i cijanobakterija.

Gujavice mogu utjecati na pH vrijednost okolnog tla. Izmet gujavica sadrži veću količinu kationa (Ca^{2+}, Mg^{2+}, K^+) nego okolno tlo i zbog toga mjeri veću pH vrijednost u odnosu na tlo

(Parkin i Berry 1999). Utječu na neutralizaciju pH vrijednosti tla što je posljedica djelovanja produkta kalcifernih žlijezda i ekskreta amonijaka (Edwards i Bohlen 1996).
Temeljem dobivenih rezultata može se vidjeti kako sterilni tretman s gujavicama ima statistički značajno veću pH vrijednost u odnosu na sterilne tretmane bez gujavica u listopadu, siječnju i veljači što se može pripisati prethodno opisanom utjecaju gujavica na pH vrijednost tla.

Soli u otopini tla provode električnu struju. Veće vrijednosti električnog konduktiviteta tla odraz je veće količine topivih soli u tlu. Visoke koncentracije soli u tlu utječu kako na fizikalna i kemijska, tako i na mikrobiološka svojstva tla. Povećane vrijednosti saliniteta u tlu smanjuju stopu respiracije i masu mikroorganizama (Laura, 1973). Smanjena mikrobiološka aktivnost posljedica je osmotskog stresa koji je usko povezan sa solnim stresom što dovodi do pada osmotskog potencijala i ograničene dostupnosti vode za mikroorganizme.
Analizom rezultata vidljivo je kako su gujavice u sterilnom tretmanu značajno utjecale na porast vrijednosti električnog konduktiviteta u studenom i prosincu, dok su u veljači utjecale na smanjenje vrijednosti. Porast konduktiviteta može se pripisati utjecaju izmeta gujavica na porast razine topljivih soli u tlu (Chaundhuri i sur., 2009).
Značajne promjene vrijednosti električnog konduktiviteta u sterilnim tretmanima nisu utjecale na značajnu promjenu aktivnosti dehidrogenaze. Malik i suradnici (1995) utvrdili su kako je aktivnost dehidrogenaze u tlu u negativnoj korelaciji sa salinitetom tla što se u provedenom istraživanju pokazalo samo u veljači u nesterilnom tretmanu.

Razgradnja organske tvari u tlu rezultat je mikrobiološke aktivnosti, ali za odvijanje samog procesa ključan je odnos između gujavica i mikroorganizama u tlu. Smatra se kako gujavice mogu stimulirati mikrobiološku aktivnost tla što je povezano s različitim procesima kao što su promjena fizikalne strukture tla, proizvodnja sluzi i ekskreta kao što su urea i amonijak što može biti mjesto nakupljanja hranjivih tvari za mikroorganizme. Međutim odnos gujavica i mikroorganizama još uvijek nije razjašnjen, naročito zato što mikroorganizmi predstavljaju dio prirodne prehrane gujavica. Za razliku od mikroorganizama gujavice ne mogu asimilirati hranjive tvari, a kako bi zadovoljile potrebu za dušikom, hrane se mikroorganizmima koji koloniziraju organsku tvar. Gujavice svojom aktivnošću povećavaju dostupnost nutrijenata, aeraciju tla i vodni režim što osigurava odlične uvjete za proliferaciju mikroflore i faune (Collins i sur. 1995). Stimuliraju aktivnost ekstracelularnih enzima u tlu kao što su ureaza, fosfataza, sulfataza i b-glukozidaza. Aktivnost intracelularnih enzima kao što su

dehidrogenaza i katalaza pokazuju različite trendove (povećanje ili smanjenje) ovisno o vrsti i ekološkoj kategoriji gujavica (Kizilkaya i sur., 2011).

Nekoliko istraživanja je pokazalo kako aktivnost epigejnih gujavica inducira povećanje mikrobiološke aktivnosti. Zbog veće površine za razgradnju, smanjuju imobilizaciju površinske stelje i mijenjaju sastav mikrobne zajednice (Scheu i Parkinson, 1994). Dok neka istraživanja navode kako aktivnost detritovornih gujavica može smanjiti mikrobnu biomasu, direktno, selektivnom ishranom bakterijama i gljivama i indirektno, ubrzavajući trošenje hranjivih tvari (Dominguez, 2004; Gomez-Brandon i sur. 2010). U ovom istraživanju aktivnost mikroorganizama utvrđena je mjerenjem aktivnosti mikrobne dehidrogenaze. U sterilnom tretmanu gujavice su utjecale na značajno povećanje aktivnosti dehidrogenaze početkom inkubacije dok u zadnjem mjerenju pokazuju smanjenje, iako ne statistički značajno. U nesterilnom tretmanu gujavice su utjecale na značajno povećanje aktivnost dehidrogenaze nakon čega je u posljednjem mjesecu inkubacije uslijedilo značajno smanjenje što se može pripisati povećanom ishranom gujavica mikroorganizmima u tlu. Aktivnost mikrobne dehidrogenaze odražava metaboličku sposobnost tla i smatra se proporcionalnom biomasi mikroorganizama u tlu. Međutim, povezanost između pojedinih biokemijskih svojstva dehidrogenaze u tlu i ukupne mikrobiološke aktivnosti u tlu nije uvijek jasna, naročito u slučaju kompleksnih sustava kao što je tlo, gdje su mikroorganizmi i procesi koji su uključeni u procese razgradnje organske tvari vrlo raznoliki (Salazar i sur., 2011).

Tao i sur. (2009) dokazali su kako je aktivnost dehidrogenaze u izmetu gujavica veća nego u okolnom tlu što objašnjava interakcija enzima gujavica i bogat izvor nutrijenata pogodan za razvoj mikroorganizama. Veća aktivnost dehidrogenaze u izmetu može biti posljedica veće biomase mikroorganizama nego u okolnom tlu (Tiwari i sur., 1989). Selektivno hranjenje gujavica, organski bogatim supstratom koji se razgrađuje tijekom prolaska kroz probavilo gujavica, odgovorno je za veću mikrobiološku populaciju i veću enzimsku aktivnost u izmetu gujavica (Edwards i Bohlen, 1996). Prema navedenim saznanjima očekivala se veća aktivnost dehidrogenaze u sadržaju probavila gujavica nego u tlu što nije u skladu s dobivenim rezultatima provedenog istraživanja gdje se utvrdilo kako je aktivnost dehidrogenaze u tlu veća nego u sadržaju probavila gujavica (slika 21 i 22). Rezultati mogu biti povezani s prehrambenim navikama epigejnih gujavica koje se hrane svježom organskom tvari na površini tla koje u tretmanima nije bilo. Aira i sur. (2009) su proučavali aktivnost mikrobne dehidrogenaze u sadržaju probavila različitih vrsta epigejnih gujavica u svinjskom gnoju. Nisu utvrdili statistički značajnu razliku između sadržaja probavila i okolnog supstrata. Ako

se prethodne studije usporede s rezultatima ovog istraživanja može se zaključiti kako aktivnost mikroorganizama u sadržaju probavila gujavica ovisi o vrsti i ekološkoj kategoriji gujavica te o tipu supstrata kojim se gujavice hrane.

Većina današnjih saznanja o interakciji gujavica i mikroorganizama temeljena je na istraživanju endogejnih i anecičnih gujavica. Ipak neka istraživanja su pokazala kako i epigejne gujavice mogu modificirati mikrobiološku zajednicu tla tijekom srednjeg ili dužeg perioda (6 mjeseci do 2 godine) (Aira i sur., 2007). Tako se i u ovom istraživanju pokazala važnost učinka trajanja inkubacije na vidljive promjene izazvane gujavicama . Najveći broj stimulirajućih i destimulirajućih utjecaja gujavica na različite varijable mjerene u mikrokozmosima zabilježeno je u posljednjem mjesecu ispitivanja (tablica 6).

Sveukupno, ovo istraživanje pruža uvid u izravan učinak epigejnih gujavica na aktivnost mikroorganizama u tlu. Dodatno pokazuje kako se aktivnost mikroorganizama mijenja prolaskom kroz probavilo gujavica.

Tablica 6. Broj stimulirajućih i destimulirajućih utjecaja gujavica na različite varijable mjerene u mikrokozmosima sa sterilnim i nesterilnim tlom u razdoblju od kolovoza 2013. do veljače 2014. godine.

	$S\ g^-$ vs $S\ g^+$		$NS\ g^-$ vs $NS\ g^+$	
	pozitivno djelovanje	negativno djelovanje	pozitivno djelovanje	negativno djelovanje
Kolovoz	-	-	-	-
Rujan	aktivnost dehidrogenaze	-	pH	suha tvar organska tvar
Listopad	pH	-	-	električni konduktivtet
Studeni	električni konduktivitet	-	aktivnost dehidrogenaze	-
Prosinac	električni konduktivtet	-	električni konduktivtet	pH
Siječanj	pH	suha tvar pepel	pH aktivnost dehidrogenaze	-
Veljača	pH	suha tvar pepel električni konduktivtet	električni konduktivtet	aktivnost dehidrogenaze

5 ZAKLJUČAK

- Potencijalna mikrobiološka razgradnja organske tvari u ispitivanim tretmanima smanjuje se prolaskom kroz probavilo gujavice *Eisenia fetida* (aktivnost mikroorganizama u tlu veća je nego u sadržaju probavila gujavica).

- Gujavice *Eisenia fetida* utječu stimulirajuće na mikrobiološku aktivnosti tla u istraživanim tretmanima sve do posljednjeg mjeseca inkubacije kada pokazuju destimulirajući učinak.

- Za intenzivniji utjecaj gujavica *Eisenia fetida* na različite varijable mjerene u mikrokozmosima potreban je duži period inkubacije (6 mjeseci ili više).

- Dobiveni rezultati doprinose boljem razumijevanju biotičkih interakcija unutar terestrijalnog ekosistema što može biti korisno u daljnjem istraživanju u području mikrobne ekologije tla.

6 LITERATURA

Aira M, Monroy F, Dominguez J. 2007. *Eisenia fetida* (Oligochaeta: Lumbricidae) modifies the structure and physiological capabilities of microbial communities improving carbon mineralization during vermicomposting of pig Manure. *Microbial Ecology* 54: 662-671.

Aira M., Dominguez J. 2009. Microbial and nutrient stabilization of two animal manures after the transit through the gut of the earthworm *Eisenia fetida*. *Journal of Hazardous Materials.* 161:1234–1238.

Aira M., Monroy F., Dominguez J. 2009.Changes in bacterial numbers and microbial activity of pig slurry during gut transit of epigeic and anecic earthworms. *Journal of Hazardous Materials*. 162: 2-3.

Board N. 2008. The complete technology book on vermiculture and vermicompost. National Institute of Industrial Research, New Delhi, 15 pp.

Bouche MB. 1975. Action de la faune sur les états de lamatière organique dans les ecosystèmes. In *Humification et biodégradation*, eds: Kilbertius G, Reisinger O, Mourey A, Cancela da Fonseca JA. Pierron, Sarreguemines, 168 pp.

Bouche MB. 1977. Strategies lombiciennes. In *Soil organisms as components of ecosystems*, eds. Lohm U, Persson T. Ecological Bulletins, Stockholm, 122-132 pp.

Brown GG. 1995. How do earthworms affect microfloral and faunal community diversity. *Plant and Soil* 170: 209-231.

Brown GG, Barois I, Lavelle P. 2000. Regulation of soil organic matter dynamics and microbial activity in the drilosphere and the role of interactions with other edaphic functional domains. *European Journal of Soil Biology* 36: 177-198.

Burdock TJ, Brooks MS,' Ghaly AE. 2011. A Dehydrogenase activity test for monitoring the growth of *Streptomyces Venezuelae* in a nutrient rich medium. *Journal of Bioprocessing* and *Biotechniques* 2: 214-225.

Casida LE, Klein DA, Santoro T. 1964. Soil dehydrogenase activity. *Soil Science* 98: 371-376.

Chaudhuri PS, Sabyasachi N, Pal TK, Dey SK. 2009. Earthworm casting activities under Rubber (*Hevea brasiliensis*) plantations in Tripura (India). *World Journal of Agricultural Sciences* 5: 515-521.

Collins HP, Robertson GP, Klug MJ. 1995. The significance and regulation of soil biodiversity. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 5-22 pp.

Craswell ET., Lefroy RDB. 2001.The role and function of organic matter in tropical soils. *Nutrient Cycling in Agroecosystems* 61:7-18.

Dominguez J. 2004. State of the art and new perspectives on vermicomposting research. In *Earthworm Ecology*, ed. Edwards CA. CRC , USA, 401–424 pp.

Edwards CA, Fletcher KE.1988. Interaction between earthworms and microorganisms in organic matter breakdown. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 20:235–249.

Edwards CA. 1994. Earthworm ecology. CRC Press, Boca Raton, USA, 146-155 pp.

Edwards CA., Bohlen PJ. 1996. Biology and ecology of earthworms, Chapman and Hall, London, 120-122 pp.

Gomez-Brandon M, Lazcano C, Lores M, Dominguez J. 2010. Detritivorous earthworms modify microbial community structure and accelerate plant residue decomposition. *Applied Soil Ecology* 44:237–244.

Gong P. 1997. Dehydrogenase activity in soil: a comparison between the TTC and INT assay under their optimum conditions. *Soil Biology and Biochemistry* 29: 211-214.

Hasiotis ST. 2000. The invertebrate invasion and evolution of Mesozoic soil ecosystems: the ichnofossil record of ecological innovations. In *Phanerozoic Terrestrial Ecosystems*, eds. Gastaldo R, DiMichele W. Paleontological Society Papers, Colorado Boulder, 141-169 pp.

Jhonson C. 2009. Biology of soil Science. Oxford Book Company. Jaipur, India, 102-128 pp.

Jirout J, Pizl V. 2014. Effects of the endemic earthworm *Allolobophora hrabei* (Cernosvitov, 1935) on soil microbial communities of steppe grasslands. *Soil biology and Biocemistry* 76: 249-256.

Kizilkaya R, Karaca A, Turgay OC, Cetin SC. 2011. Earthworm interactions with soil enzymes. In *Biology of earthworms*, ed. Karaca A. Springer, Berlin, 141-158 pp.

Kumar S, Chaudhuri S, Maiti SA. 2013. Soil dehydrogenase enzyme activity in natural and mine soil. *Middle-East Journal of Scientific Research* 7: 898-906.

Laura RD. 1973. Effects of sodium carbonate on carbon and nitrogen mineralization of organic matter added to soil. *Geoderma* 9: 15-26.

Lavelle P, Lattaud C, Trigo D, Barois I. 1995. Mutualism and biodiversity in soils. *Plant and Soil* 170:23-33.

Lavelle P. 1996. Diversity of soil fauna and ecosystem function. *Biology International* 33: 3-16.

Lavelle P, Spain A. 2001. Soil ecology. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 115-129 pp.

Liang Q, Chen H, Gong Y., Yang H., Fan M., Kuzyakov Y. 2014. Effects of 15 years of manure and mineral fertilizers on enzyme activities in particle-size fractions in a North China Plain soil. *European Journal of Soil Biology* 60: 112–119.

Malik A, Kaushik A, Kaushik PC. 1995. Salinization effects on dehydrogenase activity and CO_2 evolution from soils following phytomass amendments. *Proceedings of Indian National Science Academy* 3:181-186.

Masciandaro G, Ceccanti B, Garcia C. 2000. 'In situ' vermicomposting of biological sludges and impacts on soil quality. *Soil Biology and Biochemistry* 32: 1015-1024.

McCauley A, Jones C, Jacobson J.2005. Basic soil properties. *Soil and water menagement module* 1, Montana State University Extension Service, 1-12 pp.

McLean MA, Migge-Kleian S, Parkinson D. 2006. Earthworm invasions of ecosystems devoid of earthworms: effects on soil microbes. *Biological Invasion* 8: 1257-1273.

Menta C. 2012. Soil fauna diversity. Function, soil degradation, biological indices, soil restoration. In *Biodiversity conservation and utilization in a diverse world*, ed. Lameed GA. InTech, Rijeka, Croatia 59-94 pp.

Moeskops B, Sukristiyonubowo, Buchan D, Sleutel S, Herawaty L., Husen E, Saraswati R., Setyorini D, De Neve S 2010. Soil microbial communities and activities under intensive organic and conventional vegetable farming in West Java, Indonesia. *Applied Soil Ecology* 45: 112–12.

Nagatsuka T, Furosaka C. 1980. Effects of oxygen tension on growth, respiration, and types of bacteria isolated from soil suspensions. *Soil Biology and Biochemistry* 12*:* 397-403.

Nechitaylo TY, Yakimov MM, Godinho M, Timmis KN, Belogolova E, Byzov BA, Kurakov AV, Jones DL, Golyshin PN. 2010. Effect of the earthworms *Lumbricus terrestris* and *Aporrectodea caliginosa* on bacterial diversity in soil. *Microbial ecology* 59: 574-87.

Osman KT. 2013. Forest soils: properties and menagement. Springer, Dordrecht, 47-48 pp.

Parkin TB, Berry EC.1999.Microbial nitrogen transformations in earthworm burrows. *Soil Biolgy and Biochemistry* 31:1765–1771.

Parmelee RW, Beare MH, Cheng W, Hendrix EF, Rider SJ, Crossley DA, Coleman DC. 1990. Earthworms and enchytraeids in conventional and no-tillage agroecosystems: A biocide approach to assess their role in organic matter breakdown. *Biology and Fertility of Soils* 0:1-10.

Paul EA., Clark FE. 1989. Soil microbiology and biochemistry. Academic Press, New York, 75 pp.

Salazar S, Sanchez L; Alvarez J; Valverde A, Galindo P, Igual J, Peix A, Santa-Regina I. 2011. Correlation Among Soil Enzyme Activities Under Different Forest System Management Practices. *Ecological Engineering* 37:1123-1131.

Scheu S, Parkinson D. 1994. Effects of earthworms on nutrient dynamics, carbon turnover and microorganisms in soil from cool temperate forests on the Canadian Rocky Mountains-laboratory studies. *Applied Soil Ecology* 1:113-125.

Scheu S, Schlitt N, Tiunov A, Newington JE, Hefin Jones T. 2002. Effects of the presence and community composition of earthworms on microbial community functioning. *Oecologia* 133: 254-260.

Shukla G, Varma A. 2011. Soil Enzymology. Soil Biology. Springer, Dordrecht, 119-133 pp.

Shuler M, Kargi F. 2010 Bioprocess Engineering Basic Concepts. Prentice-Hall Incorporation, Englewood Cliffs, New Jersey.

Siddique J, Khan AA, Hussain I, Akhter S. 2005. Growth and reproduction of earthworm *(Eisenia fetida)* in different organic media. *Pakistan Journal of Zoology* 37: 211-214.

Sinsabaugh RL, Antibus RK, Linkins AE. 1991. An enzymic approach to the analysis of microbial activity during plant litter decomposition. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 34:43—54.

Subhani A, Changyong H, Zhengmiao Y, Min L, El-ghamry A. 2001. Impact of soil environment and agronomic practices on microbial/dehydrogenase enzyme activity in soil. A Review. *Pakistan Journal of Biological Science* 4: 333-338.

Tao J, Griffiths B, Zhang S, Chen X, Liu M , Hu F, Huixin Li H. 2009. Effects of earthworms on soil enzyme activity in an organic residue amended rice–wheat rotation agro-ecosystem. *Applied Soil Ecology* 42:221–226.

Tiquia SM, Tam NFY. 2000. Co-composting of spent pig litter and sludge with forced-aeration. *Bioresource Technology* 72: 1-7.

Tiwari SC, Tiwari BK, Mishra RR. 1989.Microbial populations, enzyme activities and nitrogen–phosphorus–potassium enrichment in earthworm casts and in the surrounding soil of a pineapple plantation. *Biology and Fertility of Soils* 8: 178–182.

Trevors JT. 1984. Effect of substrate concentration, inorganic nitrogen, O_2 concentration, temperature and pH on dehydrogenase activity in soil. *Plant and Soil* 77: 285-293.

Wallwork JA. 1970. Ecology of soil animals. McGraw – Hill, New York 38 pp.

Whalen JK, Sampedro L. 2010. Soil Ecology and Management. CABI Publishers, Wallingford, UK 49-52 pp.

Wolinska A, Stępniewska Z. 2012. Dehydrogenase activity in the aoil environment. In *Dehydrogenases*, ed. Canuto RA. InTech, Rijeka, Croatia 183-185 pp.

Yuan BC, Yue DX. 2012. Soil microbial and enzymatic activities across a chronosequence of chinese pine plantation development on the Loess Plateau of China. *Pedosphere* 22:1-12.

WEB IZVOR

1. http://www.ctahr.hawaii.edu/mauisoil/a_comp.aspx

2. https://thesoilhuggersjourney.wordpress.com/category/soil/

3. http://1.bp.blogspot.com/-1VTnT9PXfVU/UqtxmN4_ubI/AAAAAAAACD0/xY4tO_X7tXE/s1600/Earth+worms.png

4. http://www.faunaeur.org/full_results.php?id=178401

5. http://www.gogoribolov.hr/images/slide0002_image005.jpg

7 PRILOZI

Tablica I. Fizikalna ((DW, AW, AFDW) (g)) i kemijska svojstva tla ispitivanih tretmana te količina formazana ((INTF) (mg g^{-1} h^{-1})) u tlu i sadržaju probavila gujavica (spb).

	TRETMAN	KANTICA	pH	æ	DW	AW	AFDW	INTF (tlo)	INTF (spb)
kolovoz	S g-	1	7,65	195,29	0,89	0,82	0,06	23,11	
		2	7,59	177,84	0,97	0,90	0,07	23,13	
		3	7,61	169,90	0,84	0,78	0,06	23,68	
		4	7,56	175,17	0,86	0,80	0,06	30,55	
		5	7,39	179,01	0,87	0,81	0,06	22,98	
	S g+	6	6,17	166,50	0,88	0,82	0,06	34,06	
		7	6,20	156,25	0,85	0,90	0,07	31,61	
		8	6,23	162,43	0,86	0,78	0,06	32,48	
		9	6,22	167,32	0,87	0,80	0,06	31,37	
		10	6,28	173,36	0,88	0,81	0,06	21,00	
	NS g-	11	7,38	191,35	0,87	0,83	0,07	37,50	
		12	7,51	176,41	0,89	0,82	0,07	36,11	
		13	7,50	178,47	0,86	0,79	0,07	31,86	
		14	7,45	181,73	0,88	0,82	0,07	36,12	
		15	7,43	193,89	0,88	0,78	0,07	40,60	
	NS g+	16	6,92	188,46	0,89	0,83	0,07	39,36	
		17	6,95	150,14	0,88	0,82	0,07	27,53	
		18	6,95	133,40	0,87	0,79	0,07	24,32	
		19	7,01	165,22	0,89	0,82	0,07	28,89	
		20	7,05	172,31	0,85	0,78	0,07	33,52	

*nastavak tablice I.

rujan	S g-	1	4,41	161,28	0,88	0,82	0,05	23,81	
		2	4,24	160,33	0,89	0,84	0,05	7,83	
		3	4,27	167,11	0,89	0,83	0,06	12,78	
		4	4,25	144,02	0,88	0,82	0,06	8,58	
		5	4,11	172,55	0,89	0,84	0,06	9,31	
	S g+	6	4,34	193,02	0,88	0,83	0,05	46,70	30,77
		7	4,38	146,93	0,89	0,84	0,05	39,11	34,96
		8	4,37	141,27	0,89	0,84	0,05	43,90	43,21
		9	4,37	143,83	0,88	0,82	0,05	32,09	50,71
		10	4,25	163,32	0,88	0,83	0,05	37,01	12,24
	NS g-	11	4,02	204,11	0,91	0,85	0,06	59,36	
		12	4,02	192,70	0,88	0,83	0,06	43,10	
		13	4,05	190,65	0,90	0,84	0,06	27,73	
		14	4,02	182,60	0,89	0,83	0,06	56,24	
		15	3,98	184,67	0,90	0,84	0,06	25,44	
	NS g+	16	4,21	209,05	0,87	0,80	0,06	65,24	39,47
		17	4,17	189,32	0,87	0,82	0,05	44,74	186,31
		18	4,17	181,58	0,87	0,81	0,05	49,76	59,33
		19	4,04	182,13	0,87	0,70	0,02	36,05	186,40
		20	4,23	185,01	0,86	0,91	0,05	64,76	22,45
listopad	S g-	1	4,17	235,49	0,90	0,82	0,07	70,15	
		2	4,18	231,99	0,91	0,84	0,06	64,43	
		3	4,20	232,84	0,90	0,82	0,08	83,13	
		4	4,33	246,51	0,88	0,84	0,04	62,08	
		5	4,08	246,62	0,87	0,81	0,06	66,54	
	S g+	6	4,40	268,96	0,88	0,85	0,04	75,08	3,80
		7	4,47	241,34	0,88	0,83	0,05	66,48	3,20
		8	4,24	232,87	0,89	0,84	0,05	71,93	17,41
		9	4,32	228,94	0,92	0,88	0,04	40,74	2,16
		10	4,40	240,01	0,93	0,88	0,05	69,61	6,71
	NS g-	11	4,07	301,14	0,88	0,84	0,05	58,66	
		12	4,10	284,06	0,86	0,82	0,05	79,48	
		13	4,09	324,98	0,86	0,84	0,01	81,46	
		14	4,04	303,89	0,85	0,80	0,05	79,45	
		15	3,98	311,96	0,96	0,90	0,06	60,17	
	NS g+	16	4,18	268,43	0,87	0,81	0,06	72,32	22,60
		17	4,06	252,13	0,92	0,86	0,05	71,81	16,77
		18	4,03	257,47	0,90	0,81	0,09	91,82	32,22
		19	4,01	237,64	0,94	0,88	0,05	80,11	21,70
		20	4,10	260,22	0,86	0,80	0,06	77,38	13,67

*nastavak tablice I.

studeni	S g-	1	4,30	249,27	0,91	0,86	0,06	106,38	
		2	4,30	240,67	0,90	0,84	0,06	78,06	
		3	4,23	231,58	0,94	0,88	0,06	81,33	
		4	4,24	220,10	0,93	0,88	0,05	43,98	
		5	4,14	214,94	0,94	0,88	0,05	79,64	
	S g+	6	4,36	328,58	0,88	0,83	0,05	84,24	11,40
		7	4,33	300,10	0,93	0,88	0,05	108,48	11,47
		8	4,34	278,39	0,89	0,83	0,06	100,04	15,85
		9	4,36	279,18	0,94	0,89	0,05	97,38	6,95
		10	4,37	266,47	0,87	0,82	0,04	84,75	9,54
	NS g-	11	4,05	271,82	0,88	0,84	0,04	77,02	
		12	4,07	280,83	0,87	0,85	0,02	95,87	
		13	3,98	278,05	0,94	0,89	0,05	77,03	
		14	3,97	276,70	0,89	0,84	0,05	85,37	
		15	4,07	287,44	0,86	0,83	0,04	77,97	
	NS g+	16	4,05	295,78	0,86	0,81	0,05	118,49	11,56
		17	4,00	300,71	0,87	0,82	0,04	119,65	20,56
		18	3,84	290,19	0,91	0,83	0,08	106,29	34,79
		19	3,92	284,80	0,92	0,81	0,11	108,95	25,34
		20	4,02	290,40	0,90	0,85	0,05	120,75	26,83
prosinac	S g-	1	4,30	184,07	0,88	0,83	0,05	92,48	
		2	4,33	170,02	0,88	0,83	0,05	75,98	
		3	4,37	170,45	0,88	0,83	0,05	65,94	
		4	4,29	158,40	0,87	0,83	0,05	53,03	
		5	4,45	158,81	0,89	0,84	0,05	59,42	
	S g+	6	4,36	237,93	0,95	0,90	0,05	94,74	10,35
		7	4,42	230,89	0,93	0,88	0,05	91,75	41,40
		8	4,61	216,12	0,87	0,83	0,04	94,69	7,15
		9	4,66	232,31	0,90	0,86	0,04	76,80	9,95
		10	4,62	224,97	0,88	0,84	0,04	75,27	76,37
	NS g-	11	4,26	231,45	0,92	0,87	0,05	65,69	
		12	4,38	247,56	0,84	0,83	0,01	72,76	
		13	4,24	232,51	0,87	0,82	0,05	77,28	
		14	4,41	218,67	0,93	0,88	0,05	67,33	
		15	4,50	225,49	0,89	0,84	0,05	66,95	
	NS g+	16	4,19	277,24	0,83	0,80	0,03	94,12	29,28
		17	4,23	268,79	0,86	0,80	0,05	85,42	43,04
		18	4,09	264,24	0,85	0,80	0,06	82,94	27,23
		19	4,02	268,22	0,91	0,85	0,06	94,01	26,06
		20	4,17	289,17	0,90	0,84	0,06	55,17	7,44

*nastavak tablice I.

siječanj	S g-	1	3,96	237,53	0,91	0,85	0,05	69,84	
		2	3,99	230,68	0,94	0,88	0,06	64,85	
		3	4,00	228,62	0,94	0,87	0,07	64,70	
		4	3,96	235,82	0,94	0,89	0,05	62,56	
		5	3,93	230,23	0,95	0,89	0,06	66,00	
	S g+	6	4,35	294,04	0,87	0,81	0,06	75,22	11,30
		7	4,28	263,98	0,91	0,85	0,06	81,76	13,70
		8	4,30	241,16	0,88	0,82	0,06	79,02	12,26
		9	4,43	250,39	0,87	0,83	0,05	75,58	3,60
		10	4,48	236,24	0,90	0,83	0,07	64,03	4,10
	NS g-	11	3,82	296,21	0,88	0,83	0,05	63,13	
		12	3,89	306,81	0,86	0,82	0,05	59,25	
		13	3,77	278,96	0,91	0,86	0,06	51,98	
		14	3,79	270,15	0,88	0,83	0,05	51,10	
		15	3,92	286,96	0,84	0,80	0,05	51,24	
	NS g+	16	4,12	299,33	0,89	0,82	0,08	84,51	88,10
		17	4,09	326,69	0,85	0,79	0,07	87,74	3,64
		18	4,15	296,07	0,90	0,84	0,06	64,88	4,30
		19	4,11	306,76	0,90	0,84	0,06	75,40	4,60
		20	4,03	315,86	0,86	0,80	0,06	99,12	3,10
veljača	S g-	1	4,17	226,15	0,95	0,87	0,08	74,77	
		2	4,20	219,76	0,95	0,89	0,05	66,76	
		3	4,21	231,20	0,94	0,89	0,06	56,39	
		4	4,29	240,94	0,92	0,86	0,06	56,09	
		5	4,29	286,70	0,92	0,86	0,06	67,75	
	S g+	6	4,32	237,49	0,87	0,83	0,06	68,71	9,30
		7	4,36	200,08	0,86	0,82	0,05	58,86	6,40
		8	4,47	163,80	0,90	0,86	0,06	65,20	2,20
		9	4,59	168,36	0,90	0,83	0,06	54,07	2,80
		10	4,72	144,69	0,86	0,80	0,06	46,02	2,10
	NS g-	11	3,96	299,69	0,84	0,81	0,03	71,33	
		12	3,93	314,73	0,86	0,83	0,03	70,02	
		13	4,16	292,82	0,82	0,78	0,04	64,53	
		14	3,94	289,25	0,87	0,83	0,04	53,95	
		15	3,96	317,70	0,88	0,85	0,03	65,43	
	NS g+	16	4,04	367,28	0,90	0,79	0,01	43,48	4,40
		17	3,97	401,45	0,84	0,80	0,04	45,97	17,57
		18	4,00	355,38	0,85	0,82	0,03	44,66	2,86
		19	3,97	372,63	0,88	0,84	0,04	45,56	4,30
		20	3,93	352,72	0,87	0,83	0,04	46,41	3,30