

## UDZIAŁ MIKROFLORY W ROZKŁADZIE ŁĄKOWYCH RESZTEK ROŚLINNYCH I TWORZENIE SIĘ PRÓCHNICY

Jan Walczyna

IMUZ Warszawa

Praca niniejsza jest streszczeniem oryginału, który będzie opublikowany in extenso w Rocznikach Nauk Rolniczych.

Doświadczenie nad rozkładem resztek roślinnych i tworzeniem się próchnicy przeprowadzono w płuczkach Drexela o poj. 0,5 litra, do których dodawano czysty piasek, pocięte resztki roślinne, oraz pożywkę mineralną celem przyspieszenia rozkładu. Do każdej z płuczek dodawano po 400 g piasku i 20 g resztek roślinnych suchych. Stosunek resztek roślinnych do piasku wynosił 1:20, czyli resztek było 5%. Resztki roślinne były to trawy, z domieszką roślin motylkowych i chwastów, skoszone w okresie kwitnienia. (*Festuca pratensis* 39,6%, *Dactylis glomerata* 20,7%, *Trifolium hybridum* 11,6% i kilkunastu innych gatunków w mniejszych ilościach).

Skład pożywki dodawanej do każdej z płuczek był następujący:  $K_2HPO_4$  — 0,1 g,  $NH_4NO_3$  — 0,5 g,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  — 0,1 g, NaCl — 0,03 g,  $CaCO_3$  — 0,5 g. Ponadto dodawano następujące mikroelementy w śladowych ilościach: cytrynian żelaza, Mn, B, Mo, Zn, Cu, Ni, Co. Następnie do każdej z płuczek dodawano po 97 ml wody destylowanej, co stanowiło około 60% wilgotności w przeliczeniu na całkowitą pojemność wodną piasku i resztek roślinnych. Tuż przed założeniem doświadczenia każdą z płuczek szczepiono zawiesiną sporządzoną z gleby łąkowej, której skład bakteryjny był dość bogaty, azotobakter występował do 10.000 komórek na 1 g gleby.

W wyżej podany sposób założono równolegle 6 płuczek. W celu oznaczenia stopnia mineralizacji substancji organicznej, w czasie rozkładu chwymano wydzielający się dwutlenek węgla za pomocą KOH umieszczonego w płuczkach następnych, które połączono z płuczkami z piaskiem i resztkami roślinnymi. A następnie ustawiono i połączono jeszcze jeden szereg płuczek z kwasem siarkowym, w celu schwymania wydzielającego się amoniaku.

Przez ten cały zestaw płuczek przepuszczono stale powietrze pod małym ciśnieniem z butli ze sprężonym powietrzem. Przeciętna szybkość przepływu powietrza wynosiła 1 banieczkę o  $\phi$  około 1 cm na 5 sek. na jedną płuczkę. W ten sposób przez 1 płuczkę w ciągu doby przepłynęło około 18 litrów powietrza, co przeciętnie równa się 5,2 g tlenu. Powietrze z butli przed wpuszczeniem jego do płuczek z resztkami roślinnymi i piaskiem oczyszczono z  $\text{CO}_2$  przepuszczając je przez płuczki ze stężonym  $\text{NaOH}$ . Było to więc doświadczenie nad tlenowym rozkładem resztek roślinnych.

Doświadczenie wykonywano w termostacie w temperaturze  $25^\circ (2 \pm)$ . Co 15 dni wykonywano analizy mikrobiologiczne, pobierając materiał do szczepień z dwóch równoległych płuczek z resztkami roślinnymi, o czym będzie mowa później. Natomiast co 30 dni dwie równoległe płuczki zupełnie likwidowano i otrzymano materiał do analiz chemicznych i innych.

W ten sposób wykonując co 15 dni analizy mikrobiologiczne a co 30 dni chemiczne (doświadczenie trwało w ciągu 90 dni, 6 równoległych płuczek), przeanalizowano mikroflorę w 6 okresach rozkładu, a analizy chemiczne wykonano w 3 okresach.

#### WYNIKI BADAŃ

W tabelicy poniższej podano szybkość rozkładu resztek roślinnych, które po zlikwidowaniu płuczek oddzielono od piasku, oczyszczono i po wysuszeniu ważono.

Szybkość rozkładu resztek roślinnych w płuczkach w przeliczeniu na suchą masę.

Okres rozkładu resztek	Równoległe płuczki		Średnio w g	% od całości (20)
	1	2		
1. Po 1 miesiącu zostało rozłożone w g.	10,20	9,60	9,90	49,50
2. Po 2 miesiącach zostało rozłożone w g	12,92	13,22	13,07	65,35
3. Po 3 miesiącach zostało rozłożone w g	14,12	14,75	14,43	72,15

Najwięcej resztek roślinnych zostało rozłożone w pierwszym miesiącu, aż 49,5%, w drugim 15,85% i w trzecim 6,80%. Szybkość rozkładu zależy przede wszystkim od składu chemicznego węglowodanów, zawartych w resztkach roślinnych. Węglowodany łatwo rozpuszczalne są w pierwszej kolejności i szybko rozkładane przez mikroflorę; co miało miejsce w pierwszym m-cu. W miarę zmniejszania się węglowodanów

łatwo rozpuszczalnych rozkład maleje, pozostałe węglowodany trudno rozpuszczane są powoli rozkładane.

Powyższe wnioski potwierdzają zupełnie wyniki analiz chemicznych, wykonane po 1, 2 i 3 m-cach na zawartość poszczególnych węglowodanów w resztkach roślinnych, wykonane metodą według Kszela, podaną przez Kononową.

Wyniki tych analiz pozwalają stwierdzić, że różne węglowodany zawarte w resztkach roślinnych są z różną szybkością rozkładane przez drobnoustroje. Już po 1 m-cu rozkładu skrobia została rozłożona prawie w całości tłuszczce 80,85%, białka 56,75%, hemicelulozy 41,5%, celulozy 28,92%, a ligniny zaledwie w 18,19%. Po dwóch miesiącach skrobia, tłuszczce, białka zostały rozłożone prawie w całości. Po trzech m-cach hemicelulozy zostały rozłożone w 61,79%, celulozy 59,82%, ligniny tylko w 29,23%.

Z danych tych wynika, że skrobia, tłuszczce, białka są szybko rozkładane przez drobnoustroje, znacznie wolniej są rozkładane hemicelulozy i celulozy, a całkiem wolno ligniny.

W czasie rozkładu analizowano azot ogólny i białko w płuczkach. Azot ogólny oznaczono metodą Kjeldahla. Podobnie oznaczono białko, przeliczając ilość azotu przez współczynnik 6,25.

Azot ogólny i białko w % jako średnie w przeliczeniu na suchą masę płuczek.

Tabela 2

Nazwa	Przed rozkł. %	Po 1 m-cu rozkładu		Po 2 m-ach rozkładu		Po 3 m-ach rozkładu	
		1	2	1	2	1	2
		Ilość azotu ogólnego	0,143	0,122	0,129	0,128	0,129
Ilość białka	0,45	0,61	0,61	0,54	0,52	0,46	0,47
Stosunek azotu ogólnego do białka	3,2	5,00	4,7	4,2	4,0	3,8	3,9

Wyniki te wskazują, że ilość azotu ogólnego w płuczkach prawie nie uległa zmianie w ciągu 90 dni rozkładu. Natomiast nastąpił wzrost ilości białka w stosunku do ilości początkowej. Wzrost białka był największy w pierwszym m-cu rozkładu.

Wydaje się, że wzrost białka nie zależy od wahań ogólnej ilości drobnoustrojów, o czym mowa będzie później. Interpretowana ilość białka jest zrozumiała, gdy się weźmie pod uwagę rozkład białka resztek roślinnych. Drobnoustroje już w pierwszych tygodniach rozwinęły się w miliardach na 1 g, a białko resztek roślinnych rozkładane było o wiele wolniej w stosunku do szybkości rozwoju drobnoustrojów. Stąd wynika, że drobnoustroje rozwijając się masowo syntetyzowały białko z azotu mineralnego.

W płuczkach z kwasem siarkowym do chwywania wydzielającego się amoniaku w czasie rozkładu, nie stwierdzono jego obecności.

Natomiast za pomocą KOH chwymano wydzielający się CO<sub>2</sub> i stwierdzono, że w pierwszym miesiącu rozkładu zostało zmineralizowane 24,6% węgla w stosunku do początkowej jego ilości.

### Analiza substancji próchnicznych

Już w pierwszym miesiącu rozkładu resztek roślinnych, następowało stopniowe brązowienie ich. W drugim m-cu zawartość płuczek nabrała koloru ciemnego, a w trzecim miesiącu była jeszcze ciemniejsza.

Zawartość płuczek po ich zlikwidowaniu rozdzielono na poszczególne elementy za pomocą sączenia i dekantacji. W ten sposób oddzielono piasek od resztek roślinnych nierozłożonych i frakcje związków humusowych. Związki próchniczne pozostawały w roztworze, które następnie oczyszczono za pomocą wirowania.

Kwasy huminowe po oczyszczeniu rozpuszczano w 0,1 n wodorotlenku sodu i wytrącono 0,1 n kwasem siarkowym przy słabym podgrzaniu. Po strąceniu kwasy huminowe przemywano wodą celem usunięcia jonów SO<sub>4</sub> i suszono do stałej wagi w temperaturze 70°. Następnie kwasy te poddawano analizie elementarnej na zawartość węgla, wodoru i azotu półmikroanalizą w/g metody Bobrańskiego. Tlen wyliczono z różnicy sumy węgla, wodoru, i azotu po odjęciu od 100.

Kwasy huminowe otrzymane po 1, 2 i 3 m-cach rozkładu różniły się między sobą kolorem. Kwasy wyekstrahowane po 1 m-cu rozkładu były jasne, koloru prawie szarego, po 2 m-cach były brązowe, a po 3 m-cach ciemnobrązowe.

Również kwasy te różniły się składem elementarnym. Kwasy otrzymane po jednym m-cu rozkładu zawierały 48,58% węgla, po 2 m-cach 53,32% a po 3 m-cach 53,44%, analogicznie azot 10,84%, 7,37% i 5,98%. Nieco zmniejszyła się ilość wodoru w miarę starzenia się ich. Stosunek C/N po jednym m-cu wynosił 4,5, po 2 m-cach 7,2 i po 3 m-cach 8,9.

Wynika z tego, że kwasy huminowe młode różnią się od starszych nie tylko kolorem, ale również składem elementarnym. W miarę starzenia się ich następuje wzrost ilości węgla, stają się one bardziej skarbonizowane, jednocześnie zmniejsza się znacznie ilość azotu i nieco w mniejszym stopniu ubywa wodoru.

Równocześnie stwierdzono, że w miarę starzenia się kwasów huminowych zmniejsza się znacznie ilość składników popielnych. W kwasie otrzymanym po 1 m-cu rozkładu było 70,93% popiołu, po 2 m-cach 46,48% i po 3 m-cach 38,44%. Mikroanaliza tych popiołów, wykonana

spektralnie w łuku prądu stałego z anody, metodą wzorów wewnętrznych podaną przez Farmera wykazała, że dominującym pierwiastkiem był bar. Ilość jego prawie nie różniła się we wszystkich kwasach huminowych i stanowiła około 90% wszystkich składników popielnych.

W ten sposób wyjaśniono, że bar pochodził jako zanieczyszczenie z ługu, ale bar tworząc z kwasem siarkowym połączenia trudno rozpuszczalne (siarczany baru), pozwala oznaczyć pojemność wymienną kwasów.

A więc prawie jednakowa ilość baru w popiołach kwasów huminowych, a różna ilość popiołu w tych kwasach dowodzi, że kwasy huminowe po 1 m-cu rozkładu posiadały o wiele większą pojemność sorbcyjną, aniżeli po 2 i 3 m-cach. Z tego wniosek, że pojemność sorbcyjna zmniejsza się w miarę starzenia się kwasów huminowych.

Ogólnie biorąc z danych tych wynika, że młode kwasy huminowe są jeszcze nie zupełnie ukształtowane, posiadają jaśniejszy kolor, są mniej skarbonizowane i mają większą pojemność sorbcyjną. Być może, że posiadają mniejszy ciężar cząsteczkowy. Odwrotnie, starsze kwasy huminowe posiadają ciemniejszy kolor i są bardziej skarbonizowane i mają mniejszą pojemność sorbcyjną.

Kononowa podaje, że młode kwasy huminowe są mniej skondensowane.

Z danych tych wynika to, że kwasy huminowe powstają w wyniku skomplikowanego łańcucha reakcji syntezy, zachodzących stopniowo w czasie, a nie tworzą się w wyniku jednej czy kilku reakcji zachodzących mniej więcej w tym samym czasie. Dane te rzucają pewne światło na samą biochemię tworzenia się związków próchnicznych w przyrodzie.

Równocześnie z roztworów kwasów huminowych oddzielono frakcję humin, która w postaci ciemnej masy opadła na dno. Jeszcze przy sączeniu zauważono, że część organicznej bezpostaciowej ciemnej masy nie przechodzi przez sączki o porach od 20—30 mikronów, a większość z niej przechodziła przez pory od 40—50 mikronów, co świadczy o dużej jej cząsteczce.

Następnie humina ta prawie nie rozpuszczała się w ługach. Dopiero traktując ją kwasami o wzrastającym stężeniu rozpuszczono jej znaczną ilość. Analizy elementarne wykazały, że humina ta zawierała 60 i więcej % węgla i sporo azotu. Humina wymaga jeszcze dokładnego przebadania, nie mniej ważnym jest to, że w czasie rozkładu resztek roślinnych powstawały kwasy huminowe i z pewnym opóźnieniem również humina. (Po 1 m-cu rozkładu nie zauważono huminy).

## Analizy mikrobiologiczne

Jak już we wstępie wspomniano co 15 dni wykonywano analizy mikrobiologiczne, oznaczając ogólną ilość drobnoustrojów, w tym bakterie niesporujące, formy przetrwalne, promieniowce i grzyby oraz przebieg takich procesów jak amonifikacja, nitryfikacja, denitryfikacja, występowanie azotobaktera i *clostridium pasteurianum* i rozkład błonnika.

Ogólną ilość bakterii oznaczono na następującej pożywce agarowej  $K_2HPO_4$  — 0,04%,  $KH_2PO_4$  — 0,06%,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  — 0,03%, NaCl — 0,03%,  $CaCl_2$  — 0,01% pepton — 0,125%,  $NH_4NO_3$  — 0,1% i glukoza — 1,0%. Prócz tego do pożywki dodawano w śladowych ilościach te same mikroelementy jak do płuczek.

Ogólna ilość mikroorganizmów była bardzo duża, do 60 dni rozkładu wynosiła kilka miliardów na 1 g masy rozkładanej i piasku, a po 60 dniach wzrosła do kilkunastu miliardów. Duża ilość mikroorganizmów świadczy o intensywności procesów, które zachodziły w płuczkach. W składzie mikroflory około 98% stanowiły pałeczki niesporujące, 1 do 2% formy przetrwalne i dziesiąte a nawet setne części procentu grzyby. Do 75 dni rozkładu nie stwierdzono występowania promieniowców. Dopiero po tym okresie promieniowce występowały w ilości kilkadziesiąt tysięcy na 1 g zawartości płuczki.

Pojawienie się promieniowców pod koniec rozkładu, przypuszczamy wiąże się z rozkładem wytworzonych związków próchnicznych. Po 1 m-cu rozkładu otrzymano 160 mg kwasu huminowego, po 2 m-cach 459 mg i po 3 m-ach 273 mg. Następnie jak wynika z analiz poszczególnych węglowodanów zawartych w resztkach roślinnych, pod koniec rozkładu pozostały nierozłożone tylko hemicelulozy, celulozy i ligniny, a więc węglowodany powoli i trudno rozkładane. W tym czasie wytworzone związki próchniczne na równi ze wspomnianymi węglowodanami były wykorzystywane przez mikroflorę, w tym prawdopodobnie przez promieniowce, o czym świadczy zmniejszenie się związków próchnicznych w 3 m-cu.

Cały czas rozkładu obserwowano b. intensywną amonifikację peptonu, która zachodziła w rozcieńczeniach nawet 1:10 miliardów. Następnie stwierdzono, że amonifikację dokonywały przede wszystkim bakterie niesporujące.

Natomiast w ciągu całego okresu rozkładu nie stwierdzono występowania nitryfikacji, denitryfikacji, wiązania wolnego azotu i rozkładu błonnika, pomimo że wysiewy dokonywano na różnych pożywkach.

W wyniku takiego stanu decydująca rola w rozkładzie resztek roślinnych przypada amonifikacji, który to proces jak wynika z analiz chemicznych (rozkład błonnika i innych węglowodanów) nie ogranicza

się do uwalniania amoniaku z substancji organicznej, ale również pod jego wpływem zachodził rozkład innych węglowodanów nie zawierających w swoim składzie azotu. Amonifikacja zachodzi intensywnie w glebach naturalnych, a jak wynika z tych badań może ona mieć duży związek z tworzeniem się próchnicy.

Reasumując, wyniki tych badań pozwalają stwierdzić, że rozkład resztek roślinnych dokonywany jest przez mikroflorę, która szybko wykorzystuje takie węglowodany jak skrobia, tłuszcze, białka wolniej natomiast wykorzystuje hemicelulozy, celulozy i ligniny. Duża rola w rozkładzie przypada procesowi amonifikacji, który nie ogranicza się tylko do uwalniania amoniaku z substancji organicznej ale prawdopodobnie bierze udział w rozkładzie węglowodanów nie zawierających w swoim składzie azotu.

Równocześnie z rozkładem resztek roślinnych następowało tworzenie się związków próchnicznych, tj. kwasów huminowych i humin. Młode kwasy huminowe znacznie się różnią swoimi właściwościami od starszych, co wskazuje, że są one nie zupełnie ukształtowane i podlegają dalszym zmianom fizyko-chemicznym. Stwierdzono również, że pod koniec rozkładu kiedy pozostały nie rozłożone węglowodany trudno rozpuszczalne, następował rozkład związków próchnicznych, czego prawdopodobnie dokonywały promieniowce.

Z badań tych wynika również to, że rola drobnoustrojów nie ogranicza się do rozkładu resztek roślinnych, ale prawdopodobnie biorą one czynny udział w procesach tworzenia się związków próchnicznych, które również zdolne są rozkładać.

Zastosowana tzw. metoda płuczek zasługuje na podkreślenie, pozwala ona dowolnie regulować prawie wszystkie czynniki i poznać przebieg zasadniczych procesów prawie od początku do końca, co jest trudno osiągalne innymi dotychczasowymi metodami.