ROCZNIKI GLEBOZNAWCZE T. IX, Z. 2, WARSZAWA 1960

OLGIERD NOWOSIELSKI

OZNACZANIE RÓŻNYCH FORM AZOTU ZA POMOCĄ GRZYBA *ASPERGILLUS NIGER*

Z Zakładu Chemii Rolniczej SGGW Warszawa. Kierownik prof. dr M. Górski

WSTĘP

Różnice w zwyżkach plonów pod wpływem nawożenia azotowego w zależności od rodzaju gleby są duże. Przy większych dawkach nawozów różnice te mogą być jeszcze większe. Ponieważ dawki nawozów stosowane w praktyce stale rosną, metody oznaczania potrzeb nawożenia gleb azotem nabierają coraz większego znaczenia.

Zagadnienie oznaczania azotu dostępnego oraz metody opracowane od 1955 r. omówiono w poprzedniej pracy [6]. Prowadzone w tym czasie badania przyniosły dalsze interesujące, chociaż niekiedy sprzeczne wyniki, wskazujące na złożoność tego zagadnienia.

Opisane już badania amerykańskie [6], a ostatnio także i inne wykazały, że ilość azotu mineralizującego się w wyniku inkubacji wilgotnej gleby w temperaturze pokojowej lub nieco wyższej jest proporcjonalna do ilości azotu pobieranego przez rośliny w polu lub wazonach [2, 3, 4, 5, 10, 11].

T r o u g i współpracownicy nie obserwowali jednak takiej zależności w przypadku organicznych gleb Wisconsin. Badacze ci stwierdzili natomiast dla tych gleb w doświadczeniach wazonowych doskonałą wprost korelację ($r = 0{,}95$) między zawartością azotu azotanowego zaraz po pobraniu próbek a ilością azotu w plonie tytoniu [8]. Stwierdzona przez nich w różnych glebach mineralnych korelacja zarówno między zawartością azotu azotanowego, jak i mineralizującego się a ilością azotu pobranego z nich przez kukurydzę hodowaną w wazonach była bardzo słaba [9].

H a r p s t e a d i B r a g e podają, że zawartość azotu azotanowego w powietrznie wysuszonych i następnie inkubowanych glebach była wprost

proporcjonalna do ilości azotu pobranego przez owies w polu i wazonach; stwierdzili oni, że czas przechowywania próbek glebowych w stanie powietrznie suchym miał duży wpływ na ilość azotu azotanowego, powstającego podczas inkubacji; ilość ta w próbkach przechowywanych do 3 tygodni malała, potem rosła. Najlepszą korelację z ilością azotu w plonie roślin stwierdzali oni w próbkach gleb inkubowanych po 3—8 tygodniach przechowywania w stanie powietrznie suchym [5].

Z ö t t l donosi, że uzyskuje się wprost proporcjonalną zależność między ilością azotu w plonie roślin a ilością azotu azotanowego, uruchamiającego się w próbce glebowej o wilgotności polowej, w wyniku jej inkubacji w temperaturze 20°C w ciągu 6 tygodni, przy wilgotności odpowiadającej 60% maksymalnej pojemności wodnej [11].

B r e m n e r i S h a w ulepszyli znacznie sposób oznaczania azotu mineralnego w glebie wykorzystując do tego celu zmodyfikowaną przez siebie mikrodyfuzyjną metodę Conwaya, pozwalającą oznaczać azot azotanowy i amonowy nawet w ilościach mniejszych od setnych części mg, z dokładnością do $\pm$ 0,5 γ. Metodą tą oznaczają oni azot mineralny w wyciągach z gleb inkubowanych, używając do ekstrakcji 1 n roztwór siarczanu potasu, zakwaszony kwasem siarkowym do *pH* 1,0—1,5 [1].

Dzięki zastosowaniu tej czułej metody C u n n i n g h a m i C o o k stwierdzili, że korelacja między ilością azotu w plonie roślin a zawartością w glebach azotu mineralnego może zależeć od traktowania próbki glebowej. Korelacja ta jest największa, jeśli azot mineralny oznacza się w glebie uprzednio powietrznie wysuszonej, a następnie inkubowanej w 35°C w ciągu 21 dni przy wilgotności odpowiadającej 50% maksymalnej pojemności wodnej; mniejsza — jeśli azot mineralny oznacza się w próbce gleby o wilgotności polowej i nieistotna (najmniejsza) — jeśli azot mineralny oznacza się w glebie nie wysuszonej powietrznie przed inkubacją [2, 3].

Badania G a s s e r a wykazały, że ilość azotu mineralnego znacznie wzrasta, jeśli glebę o wilgotności polowej na przemian zamraża się i odmraża kilkakrotnie, po czym inkubuje. Ilość ta wzrasta jeszcze bardziej, jeśli po cyklu zamrożeń i odmrożeń, ale przed inkubacją, doprowadzi się glebę do stanu powietrznie suchego. Dopiero w temperaturze −10°C w próbkach o wilgotności polowej zawartość azotu mineralnego nie zmienia się nawet po 30 dniach przechowywania. Jeśli próbki te jednak po odmrożeniu mają być wykorzystane jako powietrznie suche, wówczas nie powinny być przechowywane w stanie zamrożonym dłużej niż 8 dni [4].

Prace te wykazują, że sposób traktowania próbki glebowej ma duże znaczenie. Przypuszczalnie niedocenianie tego momentu jest przyczyną rozbieżności wyników niektórych badań.

BADANIA WŁASNE

CEL PRACY

Na podstawie cytowanych prac można sądzić, że dopiero w wyniku inkubacji nagromadzają się w glebie azotany, których ilość stoi w dość ścisłej korelacji z ilością azotu w plonach roślin. W wyniku inkubacji powstają jednak nie tylko azotany, ale także związki amonowe oraz wiele prostszych związków azotowych organicznych, z których część, np. mocznik, jest dostępna lub może być w krótkim czasie udostępniona dla roślin. W glebach o nieodpowiednich warunkach dla nitrifikacji ilość tych związków może przeważać nad ilością azotu azotanowego czy nawet nad ilością azotu mineralnego. Wydaje się więc, że oznaczanie azotu wszystkich mniej lub bardziej dostępnych dla roślin związków może dać lepsze wskazania o zawartości azotu dostępnego w glebie niż oznaczanie tylko azotu azotanowego czy nawet mineralnego. Dlatego też w tej pracy zajęto się opracowaniem metody pozwalającej na oznaczanie nie tylko azotu mineralnego, lecz także azotu łatwo dostępnych związków organicznych i to wprost w odważce, a więc bez sporządzania wyciągów, posługując się w tym celu grzybem *Aspergillus niger*[1].

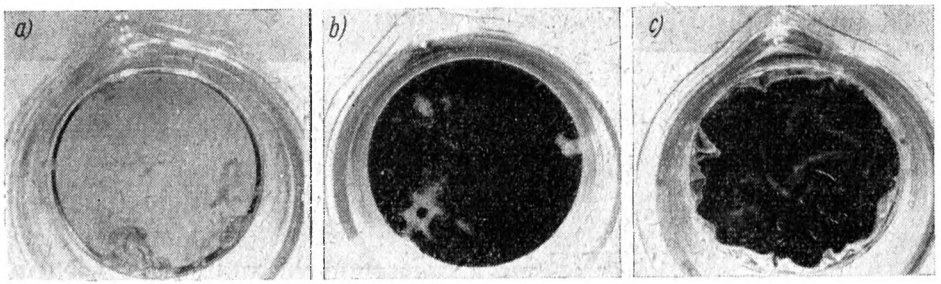
WYMAGANIA *ASPERGILLUS NIGER* W STOSUNKU DO AZOTU

Aby poznać możliwość zastosowania *Aspergillus niger* do oznaczania azotu, hodowano go na pożywce ze wzrastającymi dawkami azotu. Pożywka miała *pH* 6,5 i zawierała w litrze wody destylowanej:

50,0 g sacharozy chemicznie czystej,
2,5 g K_2HPO_4 chemicznie czystego,
1,0 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ chemicznie czystego,
5 ml roztworu mikroelementów, zawierającego w 500 ml wody:
2,5 g $FeCl_3 6H_2O$
1,0 g $ZnSO_4 7H_2O$
0,3 g $CuSO_4 5H_2O$
0,15 g $MnSO_4 4H_2O$
0,075 g $Na_2MoO_4 2H_2O$

Aby uniknąć zakłóceń wzrostu *Aspergillus niger* ze strony naturalnej mikroflory gleby, na litr pożywki dodaje się 20 g kwasu taninowego i 10 g kwasu cytrynowego.

[1] Do tego celu nadaje się także grzyb *Cunninghamella elegans*, wybrano jednak grzyba *A. niger* dlatego, że praca z nim jest łatwiejsza, a uzyskiwane wyniki dokładniejsze.

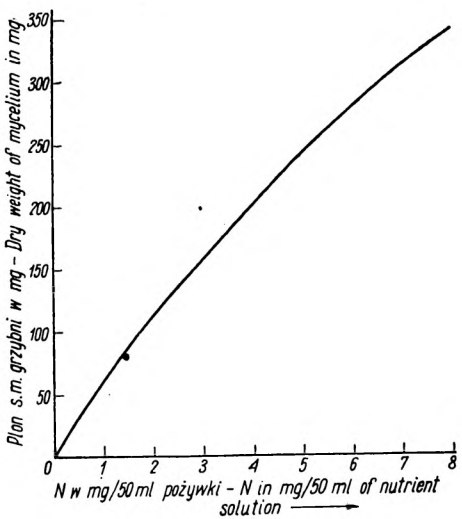


Rys. 1. Wpływ azotu na wzrost *A. niger*

a — pożywka bez dodatku azotu plon s.m. grzybni 3 mg; b — pożywka z dodatkiem 3 mg N/50 ml, plon s.m. grzybni 155 mg; c — pożywka z dodatkiem 30 mg N/50 ml, plon s.m. grzybni 1108 mg

Influence of nitrogen on growth of *A. niger*

a — nutrient solution without addition of nitrogen yields of d.m. of mycelium 3 mg; b — nutrient solution with 3 mg N/50 ml, yields of d.m. of mycelium 155 mg; c — nutrient solution with 30 mg N/50 ml, yields of d.m. of mycelium 1108 mg



Rys. 2. Wpływ wzrastających dawek azotu na plon s.m. grzybni *A. niger*
Influence of increas amounts of nitrogen on yields of d.m. of mycelium of *A. niger*

50 ml pożywki wlewano do krystalizatorów ze wzrastającymi dawkami azotu w postaci azotanu amonu, szczepiono suchymi zarodnikami, inkubowano 2,5 doby w temperaturze 35°C, po czym grzybnię zbierano, suszono i ważono. Wyniki przedstawiono na rys. 1 i 2. Już dodatek 0,1 mg N/50 ml pożywki powoduje większy przyrost suchej masy grzybni

Tablica 1

Wpływ azotu różnych związków na wzrost A. niger

Influence of nitrogen of different compounds on growth of A. niger

Rodzaj związku azotowego Kind of nitrogen compound	Plon[x] s. m. grzybni w mg z 50 ml pożywki ze związkiem azotowym w ilości odpowiadającej: Yields[x] of mycelium in mg from 50 ml nutrient solution with nitrogen compound in amount equivalent to:	
	4 mg N	20 mg N
NH_4NO_3	198	770
HNO_3	200	778
$/NH_4/_2SO_4$	195	740
NH_4CL	193	729
$Ca/NO_3/_2$	203	786
Cytrynian amonu Ammonium citrate	197	765
Glicyna Glycine	191	760
Mocznik – Urea	202	720
Kwas glutaminowy Glutamic acid	210	711
Asparagina Asparagin	208	688
Kwas moczowy Uric acid	150	408
Pepton Peptone	80	303
Pepsyna Pepsin	72	240
Albumina jaja Eggt albumin	43	180
Leucyna Leucine	38	118
Hemoglobina Hemoglobin	22	55
Kazeina Casein	17	32

[x] Średnia z 3 powtórzeń.
Mean of 3 replications.

niż wynoszą wahania między powtórzeniami. Pod wpływem dodatku 1 mg N/50 ml pożywki plon suchej masy grzybni wzrasta o około 50 mg.

Plon grzybni z pożywki bez azotu jest znikomy (ślady), plon maksymalny — około 1200 mg osiąga się przy stężeniu azotu wynoszącym 35 mg N/50 ml pożywki. Ponieważ różnice między równoległymi plonami suchej masy grzybni nie przekraczają 10 mg, zatem azot można oznaczać tą metodą w ilościach od 0,1 mg do 35 mg z dokładnością $\pm$ 0,1 mg.

FORMY AZOTU OZNACZONE ZA POMOCĄ *ASPERGILLUS NIGER*

Za pomocą *Aspergillus niger* można oznaczać azot wszystkich tych związków, z jakich może on korzystać. Badano więc przyswajalność różnych związków azotu dodając wzrastające ich dawki do pożywki bez azotu. Wyniki zamieszczono w tabl. 1. Widać z niej, że *Aspergillus niger* korzysta z azotu azotanowego i amonowego oraz w podobnym stopniu z azotu aminokwasów i amidów. W pewnym stopniu korzysta on też z azotu rozpuszczalnych w wodzie białek i peptonu. Azot związków bardziej złożonych jest dla niego prawie niedostępny.

Aspergillus niger korzysta zatem z azotu podobnych związków jak rośliny wyższe, bo z azotu mineralnego oraz azotu organicznego bądź bezpośrednio dostępnego dla roślin, jak np. mocznik, bądź ulegającego szybko mineralizacji.

OZNACZANIE AZOTU DOSTĘPNEGO W GLEBIE

Zawartość azotu dostępnego w glebie jest bardzo mała, dlatego też odważki jej muszą być tak duże, aby uzyskiwać plony grzybni nadające się do ważenia. Po zbadaniu wielu gleb stwierdzono, że odważki przy 50 ml pożywki powinny wynosić 25—50 g w przypadku gleb mineralnych i 2—10 g w przypadku gleb organicznych. Niezależnie od wielkości odważki w przeliczeniu na jednostkę masy gleby uzyskuje się azot dostępny z dokładnością $\pm$ 0,2 mg/100 g gleby.

Plony grzybni można też zwiększyć hodując ją dłuższy czas, np. 7—11 dni; zwiększają się wtedy także plony grzybni pierwszej części wzorca, a wynik oznaczenia nie ulega większej zmianie. Ponieważ jednak grzybnia starsza śluzowacieje i trudniej jest ją zebrać, wskazany jest jej zbiór po 2—3 dniach wzrostu. W tym czasie grzyb pobiera niemal cały azot dostępny (tabl. 2).

Ze względu na dużą dokładność metody oznaczania można wykonywać tylko w dwu powtórzeniach.

Opis metody: Odważkę gleby umieszcza się w krystalizatorze (ϕ 6—7 cm), wlewa 50 ml pożywki (str. 46) i po wymieszaniu z glebą

szczepi się ją suchymi zarodnikami *Aspergillus niger* i trzyma w temperaturze 35°C. Po 2,5 dobach zbiera się grzybnię, suszy i waży. Zawartość azotu dostępnego w glebie odczytuje się z krzywej wzorcowej, którą sporządza się do każdej serii oznaczeń przez dodanie do pożywek bez gleby wzrastających ilości azotu od 0 do 35 mg/50 ml pożywki[2].

Tablica 2

Wpływ czasu wzrostu A. niger na plon grzybni

Influence of time of growth of A. niger on yields of mycelium

Środowisko Medium	Plon[x] s. m. grzybni w mg po dniach wzrostu: Yields[x] of dry weight of mycelium in mg after days of growth:						
	2	3	4	5	7	9	11
Pożywka + gleba Nutrient solution + soil							
brunatna śred. próchn. brown middle rich in humus	–	77	–	90	–	125	–
lessowa zbielicowana podsolic loess	62	78	83	85	165	–	–
czarnoziem chernozem	69	74	75	75	155	150	–
bielicowa lekka podsolic light	40	43	44	46	57	90	130
Pożywka + azot–NH_4NO_3: Nutrient solution + nitrogen–NH_4NO_3:							
0,5 mg/50 ml	23	–	–	–	–	–	95
1,0 mg/50 ml	50	–	–	–	–	–	155
5,0 mg/50 ml	190	–	–	–	–	–	300
8,0 mg/50 ml	305	–	–	–	–	–	420
30,0 mg/50 ml	1012	–	–	–	–	–	560

[x] Średnia z 3 powtórzeń – Mean of 3 replications.

Przedstawiona metoda w odróżnieniu od innych pozwala na oznaczenie sumy azotu dostępnego oraz nie wymaga sporządzania wyciągów. Jest wprawdzie mniej czuła (100 γ) niż metoda Conwaya, odznacza się jednak dużą dokładnością.

[2] Odmywanie grzybni z piasku itp. przed suszeniem i ważeniem nie jest potrzebne nawet przy stosunku gleby do pożywki jak 1 : 1. Natomiast przed szczepieniem należy usunąć z powierzchni pożywki nierozłożone resztki organiczne, jeśli takie pojawią się przy mieszaniu pożywki z glebą.

Tablica 3

Wpływ wieloletniego nawożenia na zawartość azotu dostępnego i uruchamiającego się w wyniku inkubacji w glebie trwałych pasów nawozowych[x] Pola Doświadczalnego Zakładu Chemii Rolniczej SGGW w Skierniewicach

Influence of long-time fertilization on the content of nitrogen available and mobilized during incubation in the soil[x] of the Experimental Field of the Department of Agricultural Chemistry SGGW in Skierniewice

Kombinacje nawozowe: Fertilizer treatment:	Ca	CaNPK	NPK	CaPK	CaPN	CaKN	Obornik Farmyard manure q/ha		
							200	400	600
Azot w mg/100 g: Nitrogen in mg/100 g:									
a/ dostępny available	0,6	2,5	2,0	0,7	2,5	1,6	3,2	4,0	5,1
b/ uruchamiający się mobilized during incubation	1,1	6,0	5,1	1,2	6,2	3,9	4,2	9,0	14,3

Uwaga: Błąd pojedyńczego oznaczenia = ±0,2.
S. E. = ±0,2.

[x] Opis uprawy i nawożenia tej gleby podano w pracy: O. Nowosielski. Wpływ nawożenia na zawartość magnezu dostępnego.
A description of cultivation and fertilization of this soil is given in the paper: O. Nowosielski. Influence of fertilization on the content of available magnesium. (Roczn. Glebozn. 8, 1959, w druku).

Dotychczasowe badania wykazały, że istnieje wyraźna korelacja między azotem oznaczonym opisaną metodą a ilością azotu w plonie roślin (tabl. 5) [7]. Okazało się także, że metodą tą można odróżniać gleby żyzne od nieżyznych i nawożone od nie nawożonych azotem (tabl. 6 i 3).

OZNACZANIE AZOTU „URUCHAMIAJĄCEGO SIĘ"

Opisaną metodą można oznaczyć azot uruchamiający się w wyniku inkubacji gleby. Odważa się od 25 do 50 g gleby do krystalizatora i nawilża wodą destylowaną do około 50—60% maksymalnej pojemności. Szczelnie przykryty krystalizator trzyma się w temperaturze 35°C przez 7 dni. Po inkubacji zalewa się glebę 50 ml pożywki i oznacza azot dostępny. Ilość uruchamiającego się azotu zależy od wilgotności gleby

Tablica 4

Wpływ wielkości odważki na wyniki oznaczeń azotu dostępnego w glebie za pomocą A. niger

Influence of the amount of soil used on the results of determination of available nitrogen by A. niger method

Rodzaj gleby Soil type	Odważka glebowa w g/50 ml pożywki Amount of soil used in determination – g/50 ml of nutrient solution	Zawartość N dostępnego w mg/100 g gleby Content of avail. N mg/100 g of soil	
		w odważce bez dodatku azotu in sample without addition of nitrogen	w odważce z dodatkiem 2 mg $N-NO_3$ do 100 g gleby in sample with addition of 2 mg $N-NO_3$ to 100 g of soil
Gleba biel. lekka Podsol, light	10 25 50	2,3 2,0 1,9	4,2 4,0 3,9
Gleba biel. średnia Podsol medium	10 25 50	3,4 3,7 3,2	5,6 5,3 5,1
Torf wysoki Highmoor	5 10	5,5 5,7	7,1 7,2
Torf niski Lowmoor	5 10	60,2 58,7	61,6 61,3

Uwaga: Błąd oznaczenia obliczony z wzoru $\pm \sqrt{\frac{\Sigma(\bar{m}-m)^2}{n-1}} = \pm 0{,}3$ mg.
S. E. = ±0,3.

oraz od czasu i temperatury inkubacji (tabl. 6). W temperaturach wyższych ilość ta jest wyższa, w niższych — mniejsza i rośnie do pewnego czasu z długością trwania inkubacji: nadmierna wilgotność (> 70% maksymalnej pojemności wodnej) bardziej hamuje uruchamianie się azotu niż za mała wilgotność, tj. mniejsza od 50% maksymalnej pojemności wodnej (tabl. 6). Ze zmianą warunków inkubacji i gleby zmienia się ilość uruchamiającego się azotu, przeważnie proporcjonalnie do zawartości azotu dostępnego przed inkubacją. Jeśli więc wyniki mają być porównywalne, należy inkubować glebę zawsze w jednakowych warunkach.

Wstępne badania wykazały, że w przechowywanych w ciągu kilku dni próbkach glebowych o wilgotności polowej i w próbkach powietrz-

Tablica 5

Zależność między zawartością w glebie azotu dostępnego dla A. niger a zawartością azotu w plonie tytoniu (z wazonów)

Relationship between content of nitrogen available to A. niger in soil and nitrogen content in yields of tobacco plant

Nazwa gleby Soil type	Zawartość w glebie azotu: Avail. N content in soil:		Ilość azotu[x] w plonie tytoniu kg/ha Amount[x] of nitrogen in crops of tobbacco plant kg/ha
	dost. dla A. niger mg N/100 g gleby avail. N to A. niger mg N/100 g of soil	azotanowego[x] oznaczonego kolorymetr. przed wysianiem rośliny mg/100 g gl. $N-NO_3$[x] as determined by colorimetric method before sowing plant mg/100 g of soil	
Czarna ziemia pyłowa Black earth silty	7,5	0,5	134
	2,1	0,7	33
Gl. brun. śred. Brown earth medium	3,3	1,4	49
Czarnoziem zdegr. Chernozem degr.	7,1	5,4	136
	2,6	0,4	33
	6,7	4,9	117
	8,2	6,7	163
	8,4	7,2	193
	3,1	1,2	45
	3,8	2,1	79

Uwaga: Współczynnik korelacji dla a x c = 0,92 — Correl. coeff. r = 0,92.

Współczynnik korelacji dla b x c = 0,97 — Correl. coeff. r = 0,96.

[x] Dane zapożyczono z pracy L. Petersona [8].
Data derived from L. Peterson's paper [8].

nie suchych, ilość azotu dostępnego i uruchamiającego się nie ulega zmianie. Natomiast jeśli w czasie przechowywania lub inkubacji następują zmiany w wilgotności gleby, ilość azotu uruchamiającego się znacznie się zmienia (tabl. 8). Sprawa terminu pobierania próbek glebowych i sposób ich przechowywania wymaga jeszcze bliższego zbadania.

W większości zbadanych gleb ilość azotu uruchamiającego się była znacznie, nawet kilkakrotnie większa od zawartości azotu dostępnego przed inkubacją. Jest ona tym większa, im gleba jest żyźniejsza.

Tablica 6

Wpływ temperatury i czasu inkubacji gleb na ilość uruchamiającego się azotu

Influence of temperature and time of incubation on the amount of mobilized nitrogen in soil

Rodzaj gleby Type of soil	Azot dostępny przed inkubacją mg/100 g gleby Nitrogen available before incubation	Azot uruchamiający się w wyniku inkubacji mg/100 g gleby Nitrogen mobilized during incubation mg/100 g of soil								
		temperatura inkubacji temperature of incubation								
		18°C			25°C			35°C		
		czas inkubacji w dobach time of incubation in days								
		5	10	15	5	10	15	5	10	15
Gleba brun. śred. Brown soil med.	4,8	7,2	–	8,0	7,5	8,4	8,7	15,4	16,7	16,8
Less słabo zbiel. Loess weakly podzoliz	4,0	5,4	6,2	7,1	7,3	8,2	9,3	11,2	12,5	12,8
Czarnoziem zdegr. Chernozem degraded	3,4	4,2	4,9	5,1	6,4	8,3	12,4	11,9	14,2	15,7
Rędzina kred. Rendzina Chalk	3,5	4,1	4,4	4,5	4,9	–	6,8	7,9	8,8	9,1
Gl. bielic. lekka Podsol soil light	1,9	2,4	3,4	3,8	4,0	4,3	5,0	4,4	5,6	5,8
Piasek lek. brun. Sand light brown	2,0	2,1	3,0	3,8	2,3	3,0	–	2,5	3,7	3,9
Biel. lek. Podsol light +CaPK	1,0	2,2	2,2	3,0	2,3	2,5	2,5	2,5	2,7	2,7
Biel. lek. Podsol light +CaNPK	2,3	3,0	3,4	3,9	3,8	4,4	4,6	4,0	4,8	4,9

Zawartość azotu uruchamiającego się jest więc przypuszczalnie miarą nie tylko zawartości azotu dostępnego dla roślin, lecz także ogólnej żyzności gleb. Przypuszczenie to może być słuszne, ponieważ azot jest decydującym składnikiem żyzności, uruchamianie się zaś jego jest niewątpliwie procesem biologicznym, który zależy od stężenia wszystkich składników pokarmowych, decydujących o działalności mikroorganizmów glebowych.

Tablica 7

Wpływ wilgotności gleby na uruchamianie się azotu w wyniku inkubacji[x] w różnych temperaturach

Influence of soil moisture on amount of nitrogen mobilized during incubation[x] in different temperatures

Rodzaj gleby Type of soil	Azot uruchamiający się w wyniku inkub. – mg/100 g gleby N – mobilized during incub. – mg/100 g of soil								
	temperatura inkubacji temperature of incubation								
	18 °C			25 °C			35 °C		
	wilgotność gleby w % maksym. pojemn. wodn. soil moisture in percent of max. water capacity								
	30	50	70	30	50	70	30	50	70
Gleba bielicowa lekka Podzol, light	3,8	4,5	1,9	5,2	6,3	2,2	6,7	8,0	2,6
Gleba piaskowa brun. Brown sandy soil	2,2	2,7	1,8	2,7	3,3	2,0	4,3	5,2	3,1

[x] Czas inkubacji – 10 dni.

Time of incubation – 10 days.

Tablica 8

Wpływ sposobu przechowywania próbek glebowych na wyniki oznaczeń azotu dostępnego i uruchamiającego się

Results of determination of available and mobilized nitrogen as influenced by storage of soil samples

Rodzaj gleby Soil type	Sposób przechowywania próbki Storage	N dostępny N available mg/100 g	N uruchamiający się N mobilized mg/100 g
Gleba bielic. lekka Light podzol	a gleba o wilgotności polowej soil at field moisture	1,3	3,0
	b gleba powietrznie sucha[x] air dry soil[x]	1,3	3,2
	c gleba podczas inkubacji kilka razy na przemian nawilgacana i suszona soil wetted and dried alternatively several times during incubation	–	4,3
Gleba brunat. średnia Brown middle soil	a gleba o wilgotności polowej soil at field moisture	2,4	5,2
	b gleba[x] powietrznie sucha air dry soil[x]	2,5	5,1
	c gleba podczas inkubacji kilka razy na przemian nawilgacana i suszona soil wetted and dried alternatively several times during incubation	–	7,0

Uwaga: Błąd pojedynczego oznaczenia = ±0,2
S. E. = ±0,2

[x] Przechowywana 2 dni – Stored 2 days.

OZNACZANIE AZOTU DOSTĘPNEGO W NAWOZACH I INNYCH MATERIAŁACH

Metodą *Aspergillus niger* można oznaczyć azot dostępny dla *Aspergillus niger* w różnych materiałach biologicznych i innych, nie zawierających substancji trujących dla grzyba. Wstępne badania wykazały, że metodą *Aspergillus niger* można oznaczyć azot dostępny w oborniku, określać stopień rozkładu nawozów organicznych (tabl. 7), a także badać wpływ sterylizacji i innych zabiegów na uruchamianie się azotu

w torfach. Metodą tą można również oznaczyć azot ogólny po spaleniu materiału organicznego oraz zawartość azotu w nawozach mineralnych, nastawiając wzorce ze wzrastającymi stężeniami azotu w takiej formie, jaką się oznacza (tabl. 10).

Do oznaczeń azotu w materiale pozbawionym życia mikrobiologicznego można stosować pożywkę bez dodatku taniny i kwasu cytrynowego.

Tablica 9

Wpływ czasu rozkładania się obornika na zawartość w nim azotu dostępnego w przeliczeniu na s. m.

Influence of time of decomposition of farmyard manure on content of available nitrogen in d. w. of manure

Czas rozkładania się obornika w miesiącach Time of decomposition of manure in months	N dostępny w mg/100 g s. m. obornika N available in 100 g of d. w. of manure mg
1	125
2	160
3	198
5	269

Uwaga: Błąd pojedynczego oznaczania = ±0,5.
S. E. = ±0,5.

Jeśli oznacza się azot dostępny w materiale organicznym (np. w oborniku), zawierającym zwykle mieszaninę związków azotowych, wówczas nastawia się wzorzec z azotanem amonu jako związkiem będącym najlepszym miernikiem azotu dostępnego.

WNIOSKI

1. Za pomocą *Aspergillus niger* można oznaczyć azot wszystkich związków dostępnych, tj. azot mineralny plus azot związków organicznych łatwo dostępnych.
2. Azot dostępny można oznaczyć wprost w odważce unikając sporządzania wyciągów.
3. Opracowaną metodą można oznaczyć azot związków dostępnych dla *Aspergillus niger* nie tylko w glebie, lecz także w różnych materiałach biologicznych i innych, nie zawierających substancji trujących dla grzyba.

4. Dzięki czułości metody (± 0,1 mg N) można śledzić nawet małe zmiany w zawartości azotu dostępnego w glebie.

5. Istnieje wyraźna korelacja w glebie między zawartością azotu dostępnego dla *Aspergillus niger*, a ilością azotu w plonach roślin; na jej podstawie można odróżniać gleby nawożone od nie nawożonych azotem.

Tablica 10

Oznaczanie azotu w nawozach mineralnych za pomocą A. niger

Determination of nitrogen content in mineral fertilizers by A. niger

Ilość azotu w postaci salmiaku mg/ml Nitrogen in form of "salmiak" x mg/ml	
dodana added	odnaleziona (przy wzorcu z NH_4Cl) recovered (using standard with NH_4Cl)
2	2,1
4	4,2
8	8,0
12	11,9
16	16,1

Uwaga: Błąd oznaczenia = ±0,1.
S. E. = ±0,1.

x Commercial ammonium chloride.

6. W wyniku inkubacji zwiększa się, w niektórych glebach nawet kilkakrotnie, zawartość azotu dostępnego.

7. W glebach żyźniejszych, obficie nawożonych, uruchamia się w wyniku inkubacji znacznie więcej azotu dostępnego niż w glebach uboższych.

8. Azot uruchamiający się w wyniku inkubacji wskazuje przypuszczalnie nie tylko na zapas azotu dostępnego w glebie, lecz także na żyzność gleby.

STRESZCZENIE

Zastosowano grzyb *Aspergillus niger* do oznaczenia całego azotu dostępnego, tj. azotu mineralnego i azotu związków organicznych łatwo dostępnych. O zawartości azotu sądzi się z plonu suchej masy grzyba

rozwijającego się 2,5 doby w temperaturze 35°C na pożywce bezazotowej z badaną substancją. Przy 50 ml pożywki azot oznacza się w ilościach absolutnych od śladów do 35 mg, z dokładnością do ± 0,1 mg.

Metodą tą można oznaczyć azot dostępny w glebie, azot uruchamiający się w wyniku inkubacji gleby, jak również azot związków dostępnych dla *Aspergillus niger* w materiałach biologicznych i innych, nie zawierających substancji trujący dla grzyba. Oznaczeń dokonuje się wprost w odważkach unikając dzięki temu sporządzania wyciągów.

Azot uruchamiający się w wyniku inkubacji gleby oznacza się tak jak azot dostępny. Warunki inkubacji mają duży wpływ na ilość uruchamiającego się azotu i dlatego powinny być zawsze jednakowe, jeśli wyniki mają być porównywalne. Zmiany wilgotności gleby w czasie inkubacji zwiększają ilość azotu uruchamiającego się, podobnie wpływa wyższa temperatura i dłuższy czas inkubacji; czas 7 dni, temperatura 35°C i wilgotność gleby odpowiadającą 50% maksymalnej pojemności wodnej przyjęto za dobre warunki inkubacji.

Zawartość azotu dostępnego i uruchamiającego się dobrze korelują z ilością azotu w plonie roślin; na podstawie zawartości tych form azotu można odróżniać gleby nawożone i nie nawożone azotem.

W wyniku inkubacji zawartość azotu dostępnego zwiększa się znacznie, w niektórych glebach nawet kilkakrotnie; w glebach żyźniejszych uruchamia się znacznie więcej azotu dostępnego niż w glebach uboższych. Przypuszcza się, że azot uruchamiający się w wyniku inkubacji jest nie tylko miernikiem zapasów azotu dostępnego, ale także miernikiem żyzności gleby.

LITERATURA

[1] Bremner J. M., Shaw K.: Determination of amnonia and nitrate in soil. Journ. Agric. Sci. 46, s. 320—328.

[2] Cooke G. W., Cunningham R. K.: Mineralizable nitrogen determined by an incubation technique. Journ. Sci. Food Agric., No 6, s. 324—330.

[3] Cunningham R. K., Cooke G. W.: Soil nitrogen II — Changes in levels of inorganic nitrogen in a clay-loam soil caused by fertilizer additions, by leaching and uptake by grass. Journ. Sci. Food Agric., N. 6, s. 317—324.

[4] Gasser J. K.: Use of deep-freezing in the preservation and preparation of fresh soil samples. Nature 181, s. 1334—1335.

[5] Harpstead M. J., Brage B. L.: Storage of soil samples and its effect upon the subsequent accumulation of nitrate nitrogen during controlled incubation. Soil Sci. Soc. Amer. Proc. 22, s. 326—328.

[6] Nowosielski O.: Zagadnienie badania potrzeb nawozowych gleb w stosunku do azotu. Roczn. Gleb. t. 6, s. 51—78.

[7] Nowosielski O., Truog E.: Use of *Aspergillus niger* for determining nitrogen fertilizer needs soil. Soil Sci. Soc. Amer. Proc., in press.

[8] Peterson L.: Ph. D. Thesis. Dept. of Soils, University of Wisconsin, USA.
[9] Richard T.: Ms. and Ph. D. Thesis. Dept. of Soils, University of Wisconsin USA.
[10] Zöttl H. von: Die Bestimmung der Stickstoff-mineralization im Waldhumus durch... Z. Pfl. Ernähr. Düng. 81, s. 35—50.

О. НОВОСЕЛЬСКИ

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АЗОТА ДОСТУПНОГО, ПОДВИЖНОГО И ДРУГИХ ЕГО ФОРМ ПОСРЕДСТВОМ *ASPERGILLUS NIGER*

Лаборатория агрономической химии Варшавской Главной Сельскохозяйственной Школы

Резюме

Применено плесневой гриб *A. niger* для определения общего содержания доступного азота, то есть заключающегося как в соединениях минеральных так и в органических, но легко доступных. О содержании азота судили по урожаю сухого вещества гриба, произрастающего 2,5 суток, при температуре 35°C на питательной среде лишенной азота, но содержащей исследуемое вещество. В 50 мл питательной среды азот определяется в абсолютных числах, начиная от его следов до 35 мг, с точностью до $\pm 0{,}1$ мг.

По этому методу оказывается возможным определять доступный азот почвы, азот переходящий в подвижное состояние вследствие инкубации почвы, а также азот соединений доступных *A. niger* в биологических материалах и других не заключающих веществ, которые могут действовать отравляюще на гриб. Определения производятся непосредственно в навесках, вследствие чего устраняется необходимость изготовления вытяжек.

Азот, переводимый в подвижную форму вследствие инкубации почвы, определяется по методу как доступный азот. Условия инкубации сильно влияют на количество азота переводимого в подвижную форму, в виду чего они должны оставаться постоянными, если требуется получить сравнимые результаты. Колебания влажности почвы в течение инкубации повышают содержание азота переходящего в подвижное состояние. Сходно влияет повышение температуры и продолжительность инкубационного периода. В наших исследованиях инкубация почвенных проб в продолжении 7 дней при темпера-

туре 35°C и влажности почвы 50% от максимальной влажности протекала благополучно.

Существует тесная корреляция между содержанием азота доступного для растений, а также переходящего в подвижное состояние и содержанием азота в урожае растений. Основываясь на содержании этих форм азота имеется возможность отличать почвы удобренные соединениями азота от неудобренных.

В результате инкубации содержание доступного азота значительно повышается; в некоторых почвах даже в несколько раз; в более плодородных почвах более значительные количества доступного азота переходят в подвижную форму в сравнении с более бедными почвами. Предполагается, что азот, переходящий в подвижную форму вследствие инкубации, является мерой не только запасов доступного азота, но также и почвенного плодородия.

O. NOWOSIELSKI

DETERMINATION OF DIFFERENT FORMS OF NITROGEN BY MEANS OF *ASPERGILLUS NIGER*

Dept. of Agric. Chem., Central School of Rural Economics

Summary

A. niger was used for determining total available nitrogen, i.e. mineral nitrogen and nitrogen from easily available organic compounds. Nitrogen content is determined on the basis of the mycelium yield grown within 60 hours at 35 °C a N-deficient nutrient solution with the tested material. In 50 ml nutrient solution the absolute N content (from traces to 35 mg) can be determined with accuracy of $\pm$ 0,1 mg.

This method allows determination of N available in soil, N mobilized in incubated soil, and N of compounds available to *A. niger* in biological and other material, nontoxic to the fungus. Determination is made directly in the sample, avoiding thus the necessity of preparing extracts.

The nitrogen mobilized in incubated soil is determined in the same way as the available nitrogen. As the incubation conditions have a marked influence on the amount of mobilized N, they should always be uniform in order to obtain comparable data. Variations in soil moisture during incubation influence the amount of mobilized nitrogen, as do also temperature increase and prolonged incubation time. A period

of 7 days, temp. 35 °C and soil moisture equivalent to 50% max. water capacity were accepted as good incubation conditions.

The contents of available and of mobilized nitrogen show good correlation with the amount of N in plant crop; the content of these two N-forms permit to distinguish soils fertilized and not fertilized with N.

Incubation causes a marked increase in the available nitrogen which in some soils reaches several hundred percent; much more available nitrogen is being mobilized in fertile soils than in poorer ones. It is presumed that the nitrogen mobilized during incubation may be regarded as an index not only of available nitrogen supplies but also of soil fertility.