

BADANIA NAD WPŁYWEM NIEZNANYCH ZWIĄZKÓW
ORGANICZNYCH NA URODZAJNOŚĆ TORFOWISK
MELIOROWANYCH

*Kazimierz Bassalik, Ludmiła Janota-Bassalik, Janina Niewiarowska,
Cecylia Olczyk*

Zakład Fizjologii Roślin U. W.

W 1955 r. zespół pracowników naukowych Zakładu Fizjologii Roślin U. W. pod kierunkiem prof. K. Bassalika przeprowadził badania mikroflory torfu strukturalnego i rozpylonego z P. G. R. Rząśnik nad Narwią. Do badania otrzymano próbki z czterech poziomów — głębokość 5, 10, 15 i 45 cm. Oznaczono ogólną ilość mikroorganizmów w poszczególnych próbkach, oraz procent występowania bakterii, promieniowców i grzybów. Ponadto przebadano następujące procesy — rozkład błonnika, rozkład skrobi, amonifikację, wiązanie wolnego azotu, nitryfikację, denitryfikację, utlenianie siarczków i utlenianie siarki, oraz redukcję siarczanów.

Głównym zadaniem pracy niniejszej było zbadanie znaczenia nieznanych związków organicznych na urodzajność torfowisk meliorowanych. W celu rozwiązania tego zagadnienia starano się określić wpływ różnych pożywek (pożywki z glukozą, peptonem i solami, żywki z glukozą i wyciągiem z torfu gotowanym, oraz żywki z glukozą i wyciągiem z torfu niegotowanym) na rozwój mikroflory torfu. Przeprowadzono również porównanie ilości mikroorganizmów wypłukanych do wyciągu, oraz pozostałych w torfie; określono wpływ pH na rozwój mikroflory torfu.

Do badania otrzymano torf rozpylony z Biebrzy pobrany w końcu września i w końcu października 1956 r. z następujących poziomów:

- poziom M₁ — głębokość 0—10 cm,
- poziom M₂ — głębokość 10—25 cm
- poziom M₃ — głębokość 25—45 cm,
- poziom T₁ — głębokość 40—90 cm,
- poziom T₂ — głębokość poniżej 90 cm.

W próbkach pobranych ze wszystkich poziomów oznaczono procentową zawartość suchej masy, która począwszy od poziomu M_1 wynosiła — 34,7, 28,35, 19,3, 14,6, 12,4, jednakże do oznaczeń użyto jedynie próbkę pobraną z poziomu najwyższego.

Specjalne zagadnienie niniejszej pracy stanowiła sterylizacja wyciągu z torfu niegotowanego. Sterylizację tę zgodnie ze wskazówką prof. Bassalika przeprowadzano za pomocą tlenku etylenu. Podobną sterylizację stosował w swej pracy nad *Claviceps purpurea* G. Schweizer (1940/41 r.). Do 150 g pożywki dodawał Schweizer 1 ml chlorku etylenu względnie mieszaniny następujących związków $C_2H_5Cl + CH_3Cl$, $CS_2 + C_2H_5Cl$, eter petrolowy + C_2H_5Cl . Po 24 godzinach sterylizacji w temperaturze pokojowej wyżej wymieniony autor usuwał chlorek etylenu, względnie inne mieszanki sterylizujące, których punkt wrzenia nie przekraczał $27^\circ C$, za pomocą próżni.

Powtórzenie metody Schweizera do sterylizacji wyciągu torfowego nie dało dobrych wyników. Przeszło godzinne zastosowanie wodnej pompy próżniowej nie usunęło całej ilości dodanego tlenku etylenu, którego pozostała ilość nawet po dwóch dniach jeszcze hamowała rozwój zaszczipionych mikroorganizmów. Wobec powyższego opracowano metodę sterylizacji tlenkiem etylenu własną, którą następnie stosowano do wszystkich pożywek zawierających wyciąg niegotowany. Stwierdzono, że dodanie 1 ml tlenku etylenu do 100 ml wyciągu z torfu i pozostawienie go w temperaturze pokojowej przez okres czterech dni, całkowicie wyciąg wyjaławia, a ponadto nie pozostają w wyciągu po tym okresie ilości tlenku, któreby hamowały rozwój szczepionych mikroorganizmów. Zmniejszenie ilości dodawanego tlenku do 0,5 ml nie daje 100% sterylizacji. Skrócenie czasu pomiędzy dodaniem tlenku, a szczepieniem wpływa na obniżenie ilości wyrosniętych kolonii — z czego wynika, że tlenek etylenu nie ulotnił się z wyciągu całkowicie.

Pożywki do doświadczeń przygotowano w następujący sposób:

1. Pożywka agarowa z wyciągiem z torfu niegotowanym.

750 g świeżo przywiezionego torfu z poziomu M_1 wyłożono na sito do oznaczenia wilgotności gleby, wyścielono bibułą filtracyjną i pozostawiono przez 1 godz. na podsiąkanie w wodzie destylowanej wygotowanej uprzednio przez 0,5 godz. celem pozbawienia dwutlenku węgla. Mokłą masę torfu wyciśnięto ręcznie przez płótno. Otrzymany wyciąg w ilości około 300 ml pozostawiono przez noc w lodówce, przesączono i uzupełniono wodą destylowaną do 300 ml. Dodano 2% glukozy i nastawiono pH do około 7. Wyciąg wysterylizowano tlenkiem etylenu

w sposób podany powyżej. Jałowy i pozbawiony tlenu etylenu wyciąg podgrzano do temperatury 45°C i dodano do 300 ml rozpuszczonego agaru o podwójnym stężeniu w tej samej temperaturze. W rezultacie otrzymując pożywkę zawierającą wyciąg z torfu, 1% glukozy i 1,2% agaru. Pożywkę tę przed zastygnięciem rozlewano na szalki i szczepiono.

2. Pożywka agarowa z wyciągiem z torfu gotowanym.

750 g torfu zalano 750 ml wody destylowanej i wstawiono do autoklawu na 0,5 godziny pod ciśnieniem 1,5 atmosfery. Otrzymaną wygotowaną masę torfową przesączono przez bibułę filtracyjną. Uzyskano 600 ml wyciągu, którego pH nastawiono na około 7. Do 300 ml wyciągu dodano 2,5% agaru, który rozpuszczono w autoklawie. Do pozostałych 300 ml dodano 2% glukozy. Tę część wyciągu wyjaławiano w aparacie Kocha. Przed wylaniem na szalki zmieszano obie porcje, otrzymując pożywkę zawierającą wyciąg z torfu, 1% glukozy i 1,2% agaru.

3. Pożywka agarowa bez wyciągu.

Pożywkę agarową bez wyciągu przygotowano sposobem normalnie stosowanym w pracowniach mikrobiologicznych. Zawierała ona 1% glukozy, 1% peptonu, 0,1% K_2HPO_4 , 0,05% $MgSO_4$, pH pożywki wynosiło około 7.

Wpływ różnych pożywek na rozwój mikroflory torfu

Z próbki torfu pobranego z poziomu M_1 przygotowano trzy rozcieńczenia: 1 : 10.000, 1 : 100.000, 1 : 1 miliona w odniesieniu do suchej masy torfu. Rozcieńczeniami tymi zaszczepiono pożywkę z wyciągiem z torfu niegotowanym, pożywkę z wyciągiem z torfu gotowanym i pożywkę bez wyciągu. Po zaszczepieniu szalki wstawiono do termostatu o temperaturze 28°C na okres dwóch dni. Ilość kolonii liczono na szalkach szczepionych torfem w rozcieńczeniu 1 : 100.000, wyniki przedstawiono w odniesieniu do 1 g s. m. torfu. Doświadczenie powtórzono dwukrotnie otrzymując bardzo zbliżone wyniki (tab. I).

Jak wynika z tabeli 1 w torfie istnieją mikroorganizmy wymagające do swojego rozwoju substancji wzrostowych zawartych w wyciągu torfowym. Ilość kolonii otrzymanych na wyciągu niegotowanym jest prawie dwukrotnie większa niż na peptonowym agarze bez wyciągu. Wyciąg gotowany posiada o wiele słabsze własności stymulujące. W doświadczeniu naszym nie zauważyliśmy tak często dyskutowanej możli-

Tabela 1

Wpływ różnych pożywek na wzrost mikroflory torfu

Rodzaj pożywki	Doświad. I		Doświad. II		Średnia ilość kolonii z 2 dośw.	Średnia ilość mikroorganizm. w 1 g s. m. torf
	ilość kolonii	% prom	ilość kolonii	% prom		
Pożywka z wyciągiem niegotowanym	247		204			
średnio	202		246			
	224	27	225	32	225	22,500,000
Pożywka z wyciągiem gotowanym	180		172			
średnio	189		142			
	185	30	157	19	171	17,100,000
Pożywka bez wyciągu	153		95			
średnio	171		124			
	162	5	110	4	136	13,600,000

wości hamującego działania substancji antybiotycznych wydzielanych przez promieniowce w torfie. Biorąc pod uwagę działanie antybiotyczne, wyciąg surowy powinien by działać hamująco na rozwój mikroflory, w porównaniu z innymi pożywkami.

Na uwagę zasługuje również zmniejszenie procentu kolonii promieniowców na agarze bez wyciągu. Zjawisko to możnaby wytłumaczyć tym, że promieniowce są specjalnie wrażliwe na substancje wzrostowe.

Porównanie ilości mikroorganizmów wypłukanych do wyciągu oraz pozostałych w torfie

W doświadczeniu tym posługiwano się pożywką z wyciągiem z torfu, sterylizowaną w aparacie Kocha. Wyciąg przygotowano w sposób opisany poprzednio. Dodano 1% glukozy i 1,2% agaru, a pH pozostawiono w jednej porcji 5, a w drugiej nastawiono na 7.

Następnie zrobiono z 750 g torfu nowy wyciąg z którego przygotowano rozcieńczenia do szczepienia na szalki. Zrobiono również odpowiednie rozcieńczenia z wyciśniętej masy torfu. Kultury trzymano w temperaturze 28°C. Doświadczenie przeprowadzono dwukrotnie: 19.XI. i 20. XII 1956 r.

Otrzymane wyniki przeliczono w ten sposób, aby otrzymać ilość mikroorganizmów znajdujących się w 1 g suchej masy wypłukanego torfu, oraz ilość mikroorganizmów wypłukanych do wyciągu z 1 g suchej masy wypłukanego torfu.

Tabela 2

Porównanie ilości mikroorganizmów wyplukanych do wyciągu oraz pozostałych w torfie w przeliczeniu na 1 g s. m. torfu

	pH 5				pH 7			
	19. XI		20. XII		19. XI		20. XII	
	ilość	%	ilość	%	ilość	%	ilość	%
Ilość mikroorg. pozostałych w torfie	55 063 618	99,4	90 625 000	99,1	50 576 478	99,4	83 750 000	99,0
Ilość mikroorg. wyplukanych z torfu	327 250	0,6	791 800	0,9	282 030	0,6	866 700	1,0

(Podane liczby są średnimi z przeliczeń na 3 równoległych szalkach)

W doświadczeniu z dn. 20. XII. otrzymano we wszystkich wypadkach wyższe dane, ale proporcja między ilością mikroorganizmów, które przeszły do wyciągu i pozostały zatrzymane przez torf została zachowana.

Jak wynika z tabeli niezależnie od pH około 99% mikroorganizmów zostaje zatrzymane przez cząsteczki glebowe, a do wyciągu przechodzi nieznaczny procent.

Porównując średnie ilości mikroorganizmów znalezionych w 1 g s. m. torfu niewyplukanego (tab. I) i wyplukanego (tab. II), widać dużą ich przewagę w tym ostatnim. Wynik ten można wytłumaczyć zmniejszeniem sił adsorbcyjnych cząsteczek glebowych przy pełnym nasyceniu gleby wodą. Spostrzeżenie to należy wziąć pod uwagę przy porównywaniu ilości mikroorganizmów liczonych w próbkach gleby o nierównej wilgotności.

Wpływ pH pożywki na rozwój mikroflory torfu

W doświadczeniu tym użyto pożywki z wyciągiem z torfu niegotowanym. W jednej części pożywki pozostawiono pH wyciągu niezmiennione, to jest równe 5, a w drugiej zobojętniono wyciąg 0,1 n NaOH do pH 7. W tych granicach mieściły się wahania pH badanego torfu.

Szalki szczepiono rozcieńczeniami przygotowanymi z próbki torfu pobranego z poziomu M₁: 1 : 10 000, 1 : 100 000, i 1 : 1 miliona w odniesieniu do suchej masy torfu.

Jak wynika z zestawienia, zarówno przy pH 5 jak i 7 średnia ilość wyrosniętych kolonii była prawie równa. Różnica wystąpiła jedynie w wyglądzie kolonii. Kolonie na pożywce o pH 7 były większe i lepiej rozwinięte.

Tabela 3

Wpływ pH pożywki na rozwój mikroflory torfu

	Średnia ilość mikroorganizmów na 1 g s. m. torfu	
	pH 5	pH 7
Doświadczenie I	28 300 000	22 500 000
Doświadczenie II	22 900 000	28 300 000

Badania powyższe były przeprowadzone w niekorzystnym, bo dżdżystym roku, co powstrzymało typowe wystąpienie rozpylenia torfu. Musiały się przeto one z konieczności ograniczyć do spraw metodycznie ważnych i stwarzających podstawy do dalszych prac zmierzających do wyjaśnienia udziału czynnika mikrobiologicznego w procesach degradacji torfów.