

Dorota Kalembasa, Marcin Becher

AZOT I WĘGIEL WYDZIELONE HYDROLIZĄ KWASOWĄ Z PODŁOŻA POPIECZARKOWEGO

Streszczenie. Celem pracy było zbadanie zawartości azotu w formach mineralnych oraz azotu i węgla we frakcjach, uzyskanych w wyniku sekwencyjnej, dwuetapowej hydrolizy kwaśnej (przy różnym stężeniu jonów wodorowych w roztworach ekstrakcyjnych) w podłożu po uprawie pieczarki, w perspektywie jego wykorzystania do nawożenia gleb. Przeprowadzono sekwencyjne wydzielenie związków azotu i węgla, stosując roztwory $0,25 \text{ mol KCl dm}^{-3}$ (do wyekstrahowania mineralnych form azotu oraz najbardziej labilnych organicznych form azotu i węgla) oraz $0,25 \text{ mol H}_2\text{SO}_4 \text{ dm}^{-3}$ i $2,5 \text{ mol H}_2\text{SO}_4 \text{ dm}^{-3}$ (hydroliza na gorąco – do wydzielenia organicznych połączeń azotu i węgla, łatwo i trudno ulegających hydrolizie). W uzyskanych roztworach oznaczono ogólną zawartość azotu metodą Kjeldahla, a węgla metodą oksydacyjno-miareczkową. Badane podłoże po uprawie pieczarki, pochodzące z jednej nowoczesnej pieczarkarni, charakteryzowało się jednorodnością całkowitej zawartości węgla i azotu, a także ilością i udziałem badanych pierwiastków w wydzielonych frakcjach. Stwierdzono duży potencjał podłoża pieczarkowego wzbogacania nawożonych gleb w związki organiczne azotu i węgla, w znacznym stopniu potencjalnie podatnych na procesy rozkładu. W sumie, przy zastosowaniu procedury ekstrakcyjnej, z badanych podłoży po uprawie pieczarki, wydzielono 52,7% całkowitej zawartości azotu oraz 39,0% węgla organicznego. We frakcji rozpuszczalnej, łatwo i trudno hydrolizującej stwierdzono niskie i zbliżone wartości stosunku C/N. Najszerzą wartość tego ilorazu stwierdzono we frakcji nie hydrolizującej, potencjalnie najbardziej odpornej na procesy rozkładu w glebie.

Słowa kluczowe: podłoże pieczarkowe, frakcje azotu, frakcje węgla.

WPROWADZENIE

Podłoże po uprawie pieczarki, w skład którego wchodzi podłoże do uprawy grzyba (słoma, pomiot drobiowy, często z dodatkiem torfu niskiego, mocznika, białka sojowego, włókna kokosowego, dolomitu lub gipsu), oraz okrywy powierzchniowej (z dodatkiem dolomitu, wapna defekacyjnego, lub kredy łąkowej), jest odpadem o wyższej niż w oborniku zawartości składników pokarmowych, w tym azotu [3, 5, 10, 12, 13]. Centralizacja uprawy pieczarek w rejonie siedleckim, charakteryzująca się dużą ilością zużytego podłoża, wymusza poszukiwanie sposobów racjonalnego wykorzystania dużych jego mas, bez szkody dla środowiska naturalnego. Niekontrolowane składowanie zużytego podłoża w sąsiedztwie wielkotowarowych pieczarkarni, stanowi potencjalne zagrożenie wyrażające się migracją poza przyrmę związków azotu i eutrofizacją środowiska. Racjonalne stosowanie zużytego podłoża przy nawożeniu gleb wydaje się ich najwłaściwszą metodą utylizacji, dającą możliwość poprawy bilansu azotu glebowego, zwłaszcza

Dorota KALEMBASA, Marcin BECHER – Katedra Gleboznawstwa i Chemii Rolnej, Uniwersytet Humanistyczno-Przyrodniczy w Siedlcach

w glebach o niskiej zawartości próchnicy, w których azot występuje często w ilościach niewystarczających do zaspokojenia potrzeb życiowych roślin i ograniczających opłacalność produkcji [1]. Ponad 95% zasobów azotu podłoża po uprawie pieczarek występuje w związkach organicznych o różnej odporności na rozkład w glebie. W literaturze polskiej brak jest publikacji na temat organicznych połączeń azotu powyższego odpadu organicznego.

Fracjonowanie organicznych połączeń azotu w materii organicznej polega na ich hydrolizie roztworami kwasów mineralnych lub zasad oraz analizie jakościowej uzyskanych hydrolizatów [11].

Celem pracy była ocena zawartości oraz udziału azotu w formach mineralnych, oraz azotu i węgla we frakcjach, wydzielonych w wyniku hydrolizy kwaśnej, przy różnym stężeniu jonów wodorowych w odczynnikach ekstrakcyjnych, podłoża po uprawie pieczarki, w perspektywie wykorzystania go do nawożenia gleb.

MATERIAŁ I METODY BADAŃ

Materiał badawczy stanowiło podłoże po 6-tygodniowej uprawie pieczarki białej *Agaricus bisporus* (Lange Sing), pochodzące z czterech półek nowoczesnej hali uprawowej (po parowaniu dezynfekcyjnym), przed usunięciem podłoża z pieczarkarni. Każda próbka (łącznie okrywa i podłoże), pobrana była z dwunastu punktów wytypowanych półek. Uśrednione próbki ($n = 4$) wysuszono w temp. 40°C , rozdrobiono na młynku agatowym do średnicy cząstek $< 0,25$ mm i poddano analizom chemicznym (w trzech powtórzeniach). Całkowitą zawartość węgla (TC) i azotu (TN) oznaczono na autoanalyzerze Series II 2400, firmy Perkin Elmer, z detektorem przewodności cieplnej (TCD), i acetanilidem jako materiałem wzorcowym. Wszystkie wyniki badań przedstawiono, w odniesieniu do absolutnie suchej masy materiału badawczego, którą ustalono wagowo po wysuszeniu podłoża w temp. 105°C . W badanym odpadowym materiale przeprowadzono sekwencyjne wydzielenie azotu różnych związków, według metody opisanej przez Kalembasę [7], Zastosowano roztwory $0,25$ mol $\text{KCl} \cdot \text{dm}^{-3}$, do wyekstrahowania azotu w łatwo rozpuszczalnych mineralnych i organicznych formach) oraz $0,25$ mol $\text{H}_2\text{SO}_4 \cdot \text{dm}^{-3}$ i $2,5$ mol $\text{H}_2\text{SO}_4 \cdot \text{dm}^{-3}$ (3 godzinna hydroliza, w temp. wrzenia roztworu), do wydzielenia organicznych połączeń azotu, łatwo i trudno ulegającego hydrolizie). W uzyskanych roztworach oznaczono ogólną zawartość azotu metodą Kjeldahla. Mineralizację azotu w organicznych związkach (w roztworach) przeprowadzono w kolbach Kjeldahla, z których bezpośrednio po mineralizacji oddestylowano amoniak. Pominięcie etapu rozcieńczania zmineralizowanych próbek oraz zastosowanie mikropipety do miareczkowania, umożliwiło oznaczenie azotu w próbkach o małym stężeniu tego pierwiastka.

Zastosowana metoda sekwencyjnego frakcjonowania pozwoliła wyodrębnić azot glebowy w następujących formach (frakcjach):

- N-NH_4 – azot w mineralnej formie amonowej, oddestylowana z ekstraktu $0,25$ mol $\text{KCl} \cdot \text{dm}^{-3}$, po alkalizacji MgO ;

- $N\text{-NO}_3$ i $N\text{-NO}_2$ – azot w mineralnej formie amonowej, oddestylowany z ekstraktu $0,25 \text{ mol KCl} \cdot \text{dm}^{-3}$, po destylacji $N\text{-NH}_4$ i redukcji azotanów mieszaniną Devarda;
- N_{min} – azot w związkach mineralnych: $N_{\text{min}} = N\text{-NH}_4 + N\text{-NO}_3 + N\text{-NO}_2$;
- N_{org} – azot w związkach organicznych, obliczono: $N_{\text{org}} = \text{TN} - N_{\text{min}}$;
- N_{KCl} – azot po ekstrakcji w $0,25 \text{ mol KCl} \cdot \text{dm}^{-3}$ i mineralizacji roztworu;
- N_{orr} – azot organiczny łatwo rozpuszczalny, obliczono: $N_{\text{orr}} = N_{\text{KCl}} - N_{\text{min}}$;
- N_{orth} – azot organiczny łatwo hydrolizujący, po hydrolizie w $0,25 \text{ mol H}_2\text{SO}_4 \cdot \text{dm}^{-3}$ i mineralizacji roztworu;
- $N_{\text{orth-NH}_4}$ – azot oddestylowany z hydrolizatu po alkalizacji NaOH;
- N_{orth} – azot organiczny trudno hydrolizujący, po hydrolizie w $2,5 \text{ mol H}_2\text{SO}_4 \cdot \text{dm}^{-3}$ i mineralizacji roztworu;
- $N_{\text{orth-NH}_4}$ – azot oddestylowany z hydrolizatu po alkalizacji NaOH;
- N_{ornh} – azot organiczny nie hydrolizujący, pozostający w badanym materiale organicznym, po ekstrakcji KCl i dwustopniowej hydrolizie kwaśnej, obliczono z różnicy.

W uzyskanych podczas frakcjonowania roztworach oznaczono także zawartość węgla organicznego (C_{org}) metodą oksydacyjno-miareczkową [6]. Przy obliczaniu ilości węgla organicznego łatwo rozpuszczalnego uwzględniono ilość jonów Cl^- (pochodzące z KCl), które podczas mineralizacji związków organicznych powodują redukcję Cr^{+6} w $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$. Analogicznie do azotu uzyskano frakcje węgla: łatwo rozpuszczalnego (C_{orr}), łatwo hydrolizującego (C_{orth}), trudno hydrolizującego (C_{orth}) i nie hydrolizującego (C_{ornh}).

WYNIKI I DYSKUSJA

Podłoże po uprawie pieczarki w obrębie badanej hali uprawowej charakteryzowało się homogenicznością, o czym świadczą wyniki badań oraz obliczone wartości współczynnika zmienności.

Całkowita zawartość węgla (TC) w podłożu popieczarkowym (tab. 1) potwierdza duży potencjał wzbogacenia w materię organiczną gleb po zastosowaniu go w nawożeniu. Na uwagę zasługuje wysoka całkowita zawartość azotu (TN) oraz determinowany tym faktem, wąski stosunek ilości węgla do azotu. Wartość tego ilorazu była zbliżona do notowanych w intensywnie użytkowanych poziomach próchnicznych gleb mineralnych, o dobrych warunkach do mineralizacji materii organicznej [4]. Zastosowanie zużytego podłoża popieczarkowego powinno sprzyjać zwiększeniu procesów mineralizacji organicznych związków azotu, nad ich syntezą. Wyniki badań innych autorów [2, 3, 5, 10, 13] wskazują na różnice w zawartości C i N oraz C/N podłoża po uprawie pieczarki, w zależności od sposobu przygotowania, a zwłaszcza użytych komponentów na etapie wytwarzania podłoża.

Tabela 1. Zawartość węgla i azotu ($\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$) w badanym podłożu po uprawie pieczarki**Table 1.** Content of carbon and nitrogen in investigated of spent mushroom substrate

Cecha Property	Średnia Mean	Zakres Range	Odchylenie standardowe Standard deviation	Współczynnik zmienności [%] Relative standard deviation [%]
TC	304,0	287,0 - 319,0	13,1	4,33
TN	28,5	26,5 - 30,2	1,61	5,65
TC/TN	10,7	10,3 - 10,9	0,27	2,49

Tabela 2. Formy mineralne azotu podłoża po uprawie pieczarki ($\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)**Table 2.** Mineral nitrogen of spent mushroom substrate

Cecha Property	Średnia Mean	Zakres Range	Odchylenie standardowe Standard deviation	Współczynnik zmienności [%] Relative standard deviation [%]	Udział (średni) w TN [%] Share (mean) in TN [%]
N_{min}	0,750	0,623 - 0,840	0,096	12,8	2,62
N-NO_3 i N-NO_2	0,070	0,063 - 0,070	0,003	4,97	0,240
N-NH_4	0,683	0,560 - 0,770	0,093	13,6	2,39

W badanym podłożu stwierdzono średnio $0,750 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ azotu związków mineralnych, co stanowiło 2,62 % całkowitej zawartości tego pierwiastka, przy zdecydowanej dominacji formy amonowej (jako efekt procesu amonifikacji, zachodzącego w podłożu podczas uprawy pieczarki), nad azotem azotanowym. Ponad 97% zasobów azotu stanowiły jego połączenia organiczne. Zastosowana procedura ekstrakcyjna pozwoliła wydzielić azot związków organicznych w różnych frakcjach (tab. 3, rys. 1), przy sekwencyjnym zastosowaniu odczynników ekstrakcyjnych o zwiększającej się zdolności ekstrakcyjnej ($0,25 \text{ mol KCl} \cdot \text{dm}^{-3} \rightarrow 0,25 \text{ mol H}_2\text{SO}_4 \cdot \text{dm}^{-3} \rightarrow 2,5 \text{ mol H}_2\text{SO}_4 \cdot \text{dm}^{-3}$). Potencjalna podatność na rozkład mikrobiologiczny w glebie (po zastosowaniu w nawożeniu) wydzielonych związków organicznych z azotem, reprezentujących wyróżnione frakcje, układała się w szeregu: $\text{N}_{\text{orr}} > \text{N}_{\text{orth}} > \text{N}_{\text{orth}} > \text{N}_{\text{ornh}}$.

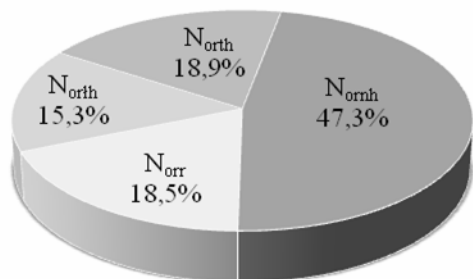
Około 20% całkowitych zasobów azotu wydzielono za pomocą $0,25 \text{ mol KCl} \cdot \text{dm}^{-3}$. Azot związków organicznych, dający się wyekstrahować odczynnikiem obojętnym o niewielkim stężeniu, może reprezentować zasoby rozpuszczalnego organicznego azotu glebowego [9], podatnego na mineralizację. Przy zastosowaniu badanego podłoża do nawożenia w dawce dopuszczalnej w dyrektywie azotanowej ($170 \text{ kg N} \cdot \text{ha}^{-1}$) [8], tj. w przeliczeniu około $6 \text{ t s. m. ha}^{-1}$, nastąpi wzbogacenie gleby w około 34 kg azotu, w połączeniach mineralnych oraz organicznych rozpuszczalnych, tj. potencjalnie szybko ulegających mineralizacji.

Tabela 3. Zawartość azotu we frakcjach wydzielonych z podłoża po uprawie pieczarki ($\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)

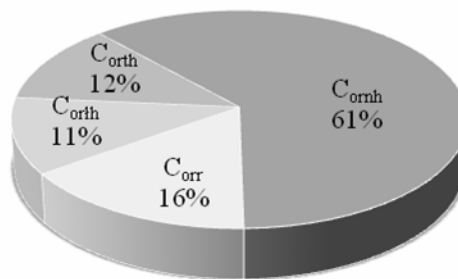
Table 3. Content of nitrogen in separated fractions of spent mushroom substrate

Cecha Property	Średnia Mean	Zakres Range	Odchylenie standardowe Standard deviation	Współczynnik zmienności [%] Relative standard deviation [%]
N_{orr}	5,13	4,84 - 5,31	0,222	4,33
N_{orth}	4,24	3,33 - 4,68	0,624	14,7
w tym $N_{\text{orth-NH}_4}$	2,76	2,59 - 2,91	0,155	5,62
N_{ornh}	5,24	5,08 - 5,32	0,112	2,14
w tym $N_{\text{orth-NH}_4}$	0,990	0,950 - 1,05	0,053	5,31
N_{ornh}	13,1	12,2 - 14,7	1,16	8,82

Azot
Nitrogen



Węgiel
Carbon



Rys 1. Udział (średni) azotu i węgla (%) we frakcjach wydzielonych z podłoża po uprawie pieczarki

Fig. 1. Share (mean) of nitrogen and carbon (%) in separated fractions of spent mushroom substrate

W wyniku dwustopniowej hydrolizy kwasowej wydzielono około 1/3 zasobów azotu, przy nieznaczonej przewadze form trudno ulegających hydrolizie. Pod wpływem hydrolizy kwasowej do roztworu przechodzi azot związany substancjami próchnicznymi oraz azot wchodzący w skład białek mikroorganizmów, które częściowo hydrolizują do amoniaku, aminokwasów, aminocukrów i innych związków organicznych [7].

Zastosowanie w procesie hydrolizy kwasu siarkowego (VI), zamiast powszechniej stosowanego kwasu chlorowodorowego, dało możliwość oznaczenia węgla organicznego (C_{org}) w kwaśnych hydrolizatach, metodą oksydacyjno-miareczkową (jony Cl^- pochodzące z HCl powodują redukcję Cr^{+6} w $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) [6]. Najwięcej węgla stwierdzono we frakcji rezydualnej (tab. 4, rys. 1) stanowiącej pulę węgla organicznego nie hydrolizującego (61%). Spośród pozostałych frakcji najwięcej węgla stwierdzono we frakcji łatwo rozpuszczalnej (C_{orr}).

Tabela 4. Zawartość węgla ($\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$) i stosunek C/N w wydzielonych frakcjach**Table 4.** Content of carbon ($\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$) and C/N ratio in separated fractions

Cecha Property	Średnia Mean	Zakres Range	Odchylenie standardowe Standard deviation	Współczynnik zmienności [%] Relative standard deviation [%]
C _{orr}	42,9	40,5 - 45,0	2,06	4,81
C _{orth}	31,5	29,4 - 33,3	1,66	5,27
C _{orth}	33,3	31,2 - 34,5	1,49	4,47
C _{ornh}	172,0	162,0 - 188,0	11,1	6,44
C/N w ekstrakcie KCl	7,30	6,83 - 7,97	0,490	6,71
C/N w hydrolizacie 0,25M H ₂ SO ₄	7,54	6,67 - 8,83	0,919	12,2
C/N w hydrolizacie 2,5M H ₂ SO ₄	6,35	6,15 - 6,53	0,178	2,81
C/N w pozostałości	13,1	12,5 - 13,8	0,565	4,31

Hydrolizie kwasowej podlegało średnio 23% całkowitych zasobów węgla organicznego, z nieznaczną przewagą we frakcji trudno hydrolizującej (mniejszą w stosunku do azotu). W roztworze uzyskanym po ekstrakcji badanych próbek podłoża chlorkiem potasu oraz w obydwu hydrolizatach (H₂SO₄), stwierdzono wąskie, poniżej 10, stosunki C/N; zbliżone we frakcji rozpuszczalnej i łatwo hydrolizującej (średnio 7,30 i 7,54) oraz nieco węższe w trudno hydrolizującej (średnio 6,35). Wartość tego ilorazu we frakcji łatwo hydrolizującej charakteryzowała się największą zmiennością. Najszerszą wartość C/N stwierdzono we frakcji nie ulegającej hydrolizie (średnio 13,1), co może potwierdzać większą odporność związków organicznych, pozostających w badanym materiale po ekstrakcjach (rezyduum), na rozkład mikrobiologiczny.

WNIOSKI

1. Podłoże po uprawie pieczarki białej *Agaricus bisporus*, charakteryzowało się jednorodnością całkowitej zawartości azotu i węgla.
2. Zastosowana procedura ekstrakcyjna, z badanego podłoża popieczarkowego pozwoliła na wydzielenie (średnio) 52,7% całkowitych zasobów azotu, i 39,0% węgla organicznego.
3. We frakcji rozpuszczalnej oraz łatwo i trudno hydrolizującej stwierdzono wąskie i zbliżone wartości stosunku C/N. Największą wartość tego ilorazu stwierdzono we frakcji nie hydrolizującej, najbardziej odpornej na rozkład.
4. Podłoże po uprawie pieczarki, jako odpadowy materiał organiczny, wskazany do rolniczego wykorzystania, stanowił potencjalne źródło azotu i węgla, w związkach w dużym stopniu biodostępnych i podatnych na procesy rozkładu w glebie.

PIŚMIENNICTWO

1. Fotyma E., Fotyma M., 2004. Podstawy zróżnicowanego nawożenia azotem. W: Diagnostyka gleb o roślin w rolnictwie równoważonym. Pr. zbior. Red. S. Kalembasa: Wydaw. AP: 49-58.
2. Gapiński M., 1996. Kompost popieczarkowy. Biuletyn Producenta Pieczarek. Pieczarki, 3.
3. Jordan S. N., Mullen G. J., Murphy M.C., 2008. Composition variability of spent mushroom compost In Ireland. *Bioresource Technology*, 99: 411-418.
4. Kalembasa D., Becher M., 2009. Properties of organic mater in chosen soils fertilized with sewage sludge. *Environment Protection Engineering*, 35, 2: 165-171.
5. Kalembasa D., Majchrowska-Safaryan A., 2009. Zasobność zużytego podłoża z pieczarkarni. *Zesz. Probl. Postępu Nauk Rol.*, 535: 195-200.
6. Kalembasa S. 1991. Quick method of determination of organic carbon in soil. *Polish Journal of Soil Science*; 24/1: 17-22.
7. Kalembasa S. 1995. Zastosowanie izotopów ^{15}N i ^{13}N w badaniach gleboznawczych i chemiczno-rolniczych. WNT, Warszawa: 251 ss.
8. Kodeks Dobrej Praktyki Rolniczej. 2004. MRiRW i MŚ, Warszawa.
9. Paul J. P., Williams B. L. 2005. Contribution of α -amin N to extractable organic nitrogen (DON) in three soil types the Scottish uplands. *Soil Biology and Biochemistry*, 37: 801-803.
10. Rutkowska B., Szulc W., Stępień W., Jobda J., Możliwości rolniczego wykorzystania zużytych podłoży po produkcji pieczarek. *Zesz. Probl. Post. Nauk Rol.*, 535: 349-356.
11. Shulten H. R., Shnitzer 1998. The chemistry of soil organic nitrogen: a review. 1998. *Biology and Fertility of Soils*, 26: 1-15
12. Stewart D.P.C., Cameron K.C., Confort I.S., 1998. Effect of spent mushroom substrate on soil chemical conditions and plant growth in an intensive horticultural system: a comparison with inorganic fertiliser. *Australian Jurnal of soil Research*, 36, 2: 75-83.
13. Zmora-Nahum S., Hadar Y., Chen Y., 2007. Physico-chemical properties of commercial composts varying in their Skurce materials and country of origin. *Soil Biology and Biochemistry*, 39: 1263-1276.

NITROGEN AND CARBON EXTRACTED BY ACID HYDROLYSIS METHOD FROM SPENT MUSHROOM SUBSTRATE

Abstract. The aim of the work was the investigation of the mineral nitrogen and the organic nitrogen and carbon in extracts of two steps acidic hydrolysis in spent mushroom substrate with the aim of use of this organic material for soil fertilization. A sequence extraction of nitrogen and carbon applying solutions of 0.25 M KCl (to extract of mineral nitrogen and the most soluble organic forms of nitrogen and carbon) and 0.25 M H_2SO_4 and 2.5 M H_2SO_4 (the boiling temperature hydrolysis to separate organic compounds of the nitrogen and carbon readily and hard hydrolyzing) has been carried. In the solutions the total content of the nitrogen has been determined by Kjeldahl method and organic carbon by oxidation-titration method.

The investigated spent mushroom substrate coming from the cultivation hall showed homogeneity of the total content of carbon and nitrogen and their share in separated fractions. It has been definitively determined that spent mushroom substrate gives great possibility of enriching soils with organic nitrogen and carbon which are considerably susceptible to decomposition. From investigated material using extraction solutions about 53% of the total content of nitrogen and 39% of organic carbon has been separated. Low and similar values of the ratios C/N has been obtained. The highest quotient has been found in the non-hydrolyzing fraction, thus suggesting that the compounds of this fraction are the most resistant to decompositions in soil.

Keywords: spent mushroom substrate, nitrogen fractions, carbon fractions