Bilans azotowy w akwarjach.

(Le bilan d'azote dans les aquariums)

napisał

K. BASSALIK.

W niniejszym komunikacie przedstawię krótko wyniki ilościowych doświadczeń orjentacyjnych w sprawie ustalenia bilansu azotowego w akwarjach. Zagadnienie, którego pierwszą próbę rozwiązania poniżej przedstawię, ma duże znaczenie dla biologii wód naturalnych a przede wszystkim dla gospodarstwa stawowego. Wpływanie człowieka na wydajność plonów gleby, jakkolwiek oparta na wiekowych doświadczeniach i na wynikach niezliczonych prac badawczych, prowadzonych przez z górą setkę lat przez całe zastępy uczonych gleboznawców, chemików rolniczych i fizjologów, nie zawsze daje, mimo umiejętnego stosowania wskazań czy to uprawnych czy nawozowych, pożądane wyniki. O wiele gorzej przedstawia się sprawa dla gospodarstwa stawowego, nie opierającego się na tak długim tradycyjnym doświadczeniu jakie posiadał rolnik, i bardzo słabo wspomaganego przez badania naukowe, rozpoczęte dopiero w ostatnich zaledwie 20 latach. Niewątpliwie, że splót zależności naturalnych prowadzących od jakiegoś zabiegu człowieka, np. nawożenia stawu do produkcji mięsa rybnego jest o wiele więcej złożonym niż przy produkcji rolniczej. To też zrozumiałem jest, że wyniki szeroko zakrojonych i z dużym nakładem środków zapoczątkowanych w r. 1914 przez B. H o f e r a w Wielenbach a kontynuowanych przez R. D e m o l l ' a doświadczeń nawozowych i uprawnych, jak i również doświadczeń takich Z u n t z ' a w Sachsenhausen, mimo, że obydwie grupy doświadczeń przeprowadzono na stawach dobrze przygotowanych zbadanych i obejmujących gleby (dna) stawowe różne, są niejasne, częstokroć bardzo sprzeczne i nie dają przede wszystkim należycie ugruntowanych wskazówek praktycz-

nych. Moje własne w tym kierunku podjęte wysiłki, przeprowadzane przez 11 lat w mojem gospodarstwie stawowem w Dąbrowie, nie dały mi również żadnych konkretnych dających się uogólnić wyników i wskazań. Sądzę przeto, że chcąc wnikać głębiej w zawile stosunki biologji wodnej, należy znaleźć metody ilościowe, przy pomocy których udałoby się może wnikać skuteczniej w te stosunki, poznać poszczególne człony warunków zależności bytu roślinnego i zwierzęcego.

Chcąc zdobyć wgląd w całość procesów odbywających się w wodach, a następnie wyprowadzić z niego zrozumienie poszczególnych ogniw tych procesów, należy, mojem zdaniem, ustalić w pierw podstawy statyki chemicznej wód. Na takich podstawach dopiero, sądzą będzie można budować dalsze poznawanie prowadzące do wyjaśnienia dynamiki tych procesów. Stawilem sobie pytanie, czy doświadczenia *a k w a r j o w e*, należycie prowadzone, nie mogłyby stanowić dla tego celu równie dobrego choć ograniczonego środka, jakim są doświadczenia *w a z o n o w e* w praktyce badań warunków produkcji roślinnej.

METODYKA.

Powyżej sformułowane zadanie starałem się wykonać przy pomocy akwarjów, częściowo prowadzonych jakościowo, częściowo ilościowo. Tylko doświadczenie *i l o ś c i o w e* tutaj pokrótce zreferuję, odkładając podanie całości wyników na później, kiedy dalej prowadzone doświadczenia dadzą może przejrzystsze i pełniejsze wyniki. Przytem ograniczę się do wyników odnoszących się do *a z o t u*, który z pośród czynników chemicznych warunkujących rozwój organizmów, największym, zdaje się, ulega przemianom.

Doświadczenia dla stwierdzenia bilansu azotu postawiono 28. VI. 1930, a zlikwidowano je 28. X. 1931; trwały więc przez 487 dni. Doświadczenie to zostało przeprowadzone w 2 grupach po 2 akwarja, równych co do pojemności ($24 \times 20 \times 25 = 12000 \text{ cm}^3$) i powierzchni (500 cm^2).

Do każdego akwarjum wprowadzono po 1 kg. gliny garmcarskiej sterylizowanej, zawierającej 0,67% H_2O i po 10 litrów wody destylowanej ze szkła. Pozatem dodano do *w s z y s t k i c h* akwarjów po 1,0 g K_2HPO_4 , 1,0 g MgSO_4 , 0,5 g NaCl i 2,0 g Ca CO_3 . Akwarja 1 i 2 otrzymały pozatem po 1,0 g $\text{NH}_4 \text{NO}_3 = 350 \text{ mg N}$. Chemikalja użyte były preparatami Kahl-

baumu *puriss.* Prócz tego wprowadzono do każdego akwarjum po gałązce *Ceratophyllum demersum* L., ważącej na świeżo dokładnie 3,0 gr. po 1 roślinie 2-listkowej *Spirodela polyrrhiza* Schleid., po 3 rośl. *Lemna minor* L., po 2 rośl. 2-listkowe *Salvinia natans* All., po 25 cm³ zawiesiny glonów, w których przeważała *Chlamydomonas*, i po 25 cm³ wody akwarjowej z *Daphnia pulex* Geer, *Cyclops strenuus* S. Fisch. i *Cypris fuscata* Jur., przy czem ilościowo b. znacznie przeważała *Daphnia*.

Ilość wprowadzonej w postaci organizmów do każdego akwarjum suchej substancyj = 0,13 g = 3,82 mg N. Ph określono potencjometrycznie, które wszędzie wynosiło 7.3 z małemi odchyleniami. Akwarja umieszczono na oknie północnem, dokąd słońce dochodziło tylko w lecie na krótko pod sam wieczór; pozycję akwarjów przed oknem zmieniano celem możliwie najrównomierniejszego ich naświetlenia. W pokoju z akwarjami jest przewód gazowy z 4-ma kurkami, ale gazu nie palono. Wodę wyparowaną uzupełniano (wodą dest. ze szkła), ale nie codziennie.

Oznaczenia azotu całk. dokonywano met. Kjeldahla i Ulscha w kombinacji wedł. C. Olsena (7), tak samo jak oznaczenie azotynów i azotanów; a amoniaku w glinie wedł. Olsena (8), biorąc jednak z każdego akwarjum po 4, czasem nawet po 6 próbek po 50 g. Organiczny rozpuszczalny azot obliczano z różnicy między całkowitym a rozpuszczalnym nieorganicznym.

PRZEBIEG WEGETACJI.

Zdolność wiązania azotu, w chwili postawienia doświadczenia, była żadna, co stwierdzono przez przeniesienie 3 cm³ mętnej początkowo zawartości akwarjów na odpowiednią pożywkę. Po upływie 3 tygodni zaszczepiono ponadto akwarjum Nr. 3 czystą hodowlą *Azotobacter chroococcum* Beij., szczep P8 i takąż kulturą *Clostridium Pastcurianum* Winogr. W toku trwania doświadczenia pojawiły się wcześniej już, a zwłaszcza w akw. 1 i 2, glony nitkowe, bezwiednie wprowadzone równocześnie z *Ceratophyllum*, z których najpierw bujnie rozwinęła się *Spirogyra spec.*, później *Oedogonium*, a na ostatku *Hormidium*. Na akwarjach 1 i 2 powstał wcześniej już kożuszek (*neuston*), składający się prawie wyłącznie z bakteryj. Wielokrotnie, w toku trwania doświadczenia, pobierano próbki wody akwarjowej celem stwier-

dzenia wiązania azotu. Wegetacja, zwłaszcza makroskopowa (*Ceratophyllum*, *Lemna*) i glony nitkowe, a zwłaszcza *Spirogyra* a później *Oedogonium*, rozwinęły się szybko i bujnie w akwariach 1 i 2, znacznie później dopiero i słabiej w akwariach „bezaazotowych” 3 i 4, w których, do chwili likwidacji doświadczenia, rozwój roślinności makroskopowej pozostawał znacznie słabszy niż w akwariach 1 i 2. Natomiast rozwój roślinności mikroskopowej i glonów nitkowych powoli, ale stale, potęgował się w akwariach 3 i 4, zwłaszcza zaś w 3. Obydwa te akwarja wykazywały przez cały okres doświadczenia duże zmętnienie wody w przeciwieństwie do akwariów 1 i 2. Ściany akwariów pozostawały prawie czyste, wykazując tylko słabe naloty z *Pleurococcus* i zdaje się — *Pleurochloris* Pascher.

Dafnie rozmnożyły się, okresowo, b. silnie w akw. 2 i 3, słabiej występowały w akw. 1 i 4. Cyklops nie występował wogóle masowo, a Cypris pojawiała się masowo w pewnych okresach zwłaszcza w akw. 3.

Na dnie mniejwięcej 2 cm warstwy gliny tworzył się pulchny organiczny osad przeważnie z obumierającego planktonu i pleuston, zwłaszcza Lemny. Osad ten był, na oko, większy (do 6 mm) w akw. 3 i 4 niż w akw. 1 i 2. W akw. 3, które, jak wspomniano, zaszczepiono czystą hodowlą azotobaktera i klostridium, każda z pobranych próbek ujawniała azotobaktera. Nawet pod koniec doświadczenia, w lipcu 1931, zaczęły pojawiać się w akw. 3 b. ciekawe, dotąd, o ile mi wiadomo, nigdy nie zaobserwowane kolonie azotobaktera wielkości maleńkiej główki szpilki, gołem okiem więc wyraźnie dostrzegalne. Składały się one ze zbitych śluzowatych skupień (niekiedy łańcuszkowo ułożonych) komórek b. grubo obłonionych i silnie światło łamiących azotobaktera, znacznie mniejszych (2—3 u), niż występuje on normalnie w sztucznych hodowlach. Z tego samego akwarjum (N. 3) nie każda natomiast próbka dawała *Clostridium*, które równocześnie z azotobakterem zaszczepiono. Wszystkie zresztą akwarja wykazywały — w drugim okresie wegetacyjnym (1931) na cukrowych bezaazotowych pożywkach wiązanie azotu wolnego, jakkolwiek zdolność była nierówną. Najsilniej objawiała się ona w akw. 3, gdzie ilość związanego azotu dochodziła w końcowym okresie doświadczenia do 4,43 mg na 100 cm³ pożywki bezaazotowej z 1,71 g cukru trzcinowego, nie zniżając się w tem akwarjum nigdy poniżej 2,83 mg, natomiast w pozostałych akwariach była znacznie słabszą, osiągając 1,96 mg jako maksimum w akw. 4.

Obok azotobaktera i klostrium występowały stale inne bakterje, które stanowić będą przedmiot oddzielnej publikacji. Oczywiście, że z wyniku tych prób nie można wyprowadzać żadnych wniosków ilościowych. Postępował w podobny sposób zwłaszcza Herm. Fischer, badając stawy w Wielenbach. Wszystkie jego z tych doświadczeń wyprowadzane wnioski należy uważać za twierdzenia *wyłącznie jakościowe*, a nie za *ilościowe*, jak to ten autor pragnąłby przedstawić. Z faktu bowiem, że w badanym środowisku wodnym bytują organizmy wiążące azot wolny, nie można wyprowadzić żadnych wniosków co do wymiaru tego procesu. Jedynie analiza globalna danego środowiska wodnego może nas pouczyć o tem, w jakim stopniu istnienie czynników wiążących azot odbija się na całokształcie — na *bilansie* azotowym — danego środowiska, i w jakim stopniu proces ten wpływa na rozwój życia w danym środowisku.

Poniżej też przedstawiam tabelę (str. 370), ujmującą cyfrowo bilans azotu w opisanych akwarjach.

Z powyższej tabeli wynika, że wiązanie azotu nastąpiło we *wszystkich* akwarjach, t. j. zarówno w tych, które początkowo zaopatrzone w związki azotu (akw. 1 i 2) jak i w tych (akw. 3 i 4), które *nie* otrzymały azotu w postaci azotanu amonowego.

Tabela ta wykazuje, że ilość związanego azotu w akw. 3 i 4, które *nie* otrzymały azotanu amonowego, była wyższa niż w akwarjach 1 i 2, które otrzymały na początku po 1 g. azotanu amonu. Wpływ tej dawki azotu objawia się w tych akwarjach bardzo wyraźnie: ilość *makroskopowej* roślinności przeważa kilkakrotnie ilość jej w akwarjach „bezazotowych”, mimo że *suma* azotu końcowego w obydwóch grupach jest bardzo zbliżona. Wniosek, dający się stąd wyprowadzić jest ten, że proces biologicznego wiązania azotu odbija się w środowiskach wodnych na rozwoju roślinności *makroskopowej* nie rychło, — azot widocznie przejść musi przez długi szereg przemian, natomiast roślinność *mikroskopowa* jest znacznie czulszą na proces wiązania azotu. Zdaje się, że i *niższy* świat zwierzęcy reaguje poniekąd podobnie. Najsilniejszy rozwój dafnij był w akw. 3, w którym odbywało się również najsilniejsze wiązanie azotu. Oczywiście, że stoi to w związku z rodzajem pokarmu roślinnego, pobieranego przez niższe zwierzęta. Te z pośród nich, które żywią się planktonem roślinnym, rozwijać się będą obficie przy obfitym rozwoju tegoż planktonu. Inne, używające innych źródeł pokarmo-

TABELA I

N z początku w m/g			N na końcu w mg.							
Az. Initial en mg			Az. final en mg							
AK. Aq.	w glinie dans l'argile		Suma en somme	w rośl. dans les plantes	w wodzie dans l'eau	w ziemi rozp. solubbe dans (l'argile)		w ziemi nierozp. dans l'argile insoluble	Suma somme	Przy- bytek gain
	rozp. solub.	nierozp. insol.				cały compl.	org. organ.			
I	6.2	73.2	353.8	153.18	8.74	29.09	14.85	487.21	678.22	245.02
II	6.2	73.2	353.8	178.93	13.18	39.63	19.41	560.68	792.42	359.22
III	6.2	73.2	zaszczep Az. i Clostr. 3.8	70.84	10.66	36.54	14.30	577.78	695.92	612.62
IV	6.2	73.2	3.8	77.37	11.86	22.96	8.76	450.08	562.27	479.07

wych, reagują inaczej. Wybitnie to zaznaczyło się w ilościowym rozwoju cyklopsów, których ilość raczej przeważała w akw. 1 i 2, kiedy ilość dafnij była większa w akw. 3 i 4 („bezażotowych”) Cypris, zdawało się, była mniej od tych stosunków uzależniona, gdyż okresowo rozwijała się również obficie we wszystkich akwarjach, żerując przede wszystkim na „nalocie” (głównie *Chlorella*) ścian akwariów i na obumierających listkach.

Co do rozwoju roślinności wyższej, tutaj tylko podam, że *Ceratophyllum* rozwinęło się w akwarjach z dodatkiem azotanu amonowego b. bujnie, w drugich dwu słabo. Najsilniej z pleuston rozwinęła się *Lemna*, utrzymując się na równi przez cały okres obserwacyjny, w akwarjach z dodatkiem azotanu amonowego znacznie wcześniej i obficie niż w bezażotowych *Salvinia* rozwijała się początkowo również dobrze we wszystkich akwarjach, a zginęła dopiero pod wiosną r. 1931. Natomiast *Spirodela* wyrastała wogóle słabo, a z nastaniem krótkich jesiennych dni wyginęła we wszystkich akwarjach. Wymagania jej co do intensywności naświetlania są w każdym razie dużo większe niż rzęsy lub *Salvinii*.

Przed zlikwidowaniem doświadczenia określono ponownie potencjometrycznie PH. Wynosiło ono w akw. I: 6,72 w akw. II: 7,58, w akw. III: 7,24 i w akw IV: 7,63.

Dla uzupełnienia obrazu doświadczenia niech posłuży Tabl. II, w której zestawiono wyniki określeń substancji organicznej bezpopiołowej.

We wszystkich akwarjach nastąpił dość znaczny przyrost substancji organicznych, występujących przede wszystkim w lekkim mule, osiadłym na powierzchni gliny. Ilość substancji organicznej zawartej w tym mule przekraczała znacznie, a w akwarjach bez dodatku azotanu amonowego, wielokrotnie ilość jej zawartą w pozostałych przy życiu roślinach. Oczywiście, że cyfry te nie mogą dać żadnego obrazu o ilościach wogóle w toku doświadczenia powstałych związków węgla, gdyż nie określano wymiany gazowej.

DYSKUSJA WYNIKÓW.

Analitycznie stwierdzono, jak podaje Tablica I, we wszystkich akwarjach przybytek azotu związanego. Słabiej to występuje w akwarjach z początkową dawką azotu, silniej w akwarjach bezażotowych, tak że suma azotu ostateczna nie wykazuje w nich dużych różnic. Jeżeli otrzymane cyfry przeliczyć na hektar, to

Tabela II

Organiczna substancja, w g. Substance organique, en g.
bez popiołu sans cendre

Ak.	na początku initiale		na końcu finale					% N w s. subst. org d. l. subst. sèche org.
	w roślin. d. les plantes	w glinie (d. l'argile)	w roślin. d. les plantes	w glinie d. l'argile	w wodzie d l'eau	suma somme	przybytek gain	
I	0,13	9,50	7,76	20,33	0,40	28,49	18,86	2,38
II	"	"	5,86	31,31	0,60	37,77	28,14	2,10
III	"	"	1,56	26,83	0,81	29,20	19,57	2,38
IV	"	"	1,54	22,62	0,80	24,96	15,33	2,25

wówczas okazuje się, iż wiązanie azotu w tych akwarjach nie było ilościowo bynajmniej tak imponujące. W przeliczeniu takim otrzymujemy następujące cyfry: W akw. I (po przeliczeniu na obszar 1 ha) 49 kg, w II 72 kg, w III 122 kg, w IV 96 kg, i to w ciągu 2 okresów wegetacyjnych. Odpowiada to mniej więcej tym przyrostom azotu w glebie, jakie podawali K ü h n a później S o m m e r v i l l e lub R u s s e l. W stawach natomiast, o ile wierzyć obliczeniom H o f e r a, przyrosty azotu bywają o wiele wyższe; H o f e r obliczył je, przyjmując jako warstwę wzbogacającą się w azot tylko górną 3-centymetrową dna stanowego, na 537 kg na 1 ha w ciągu 1 roku! Coprawda w akwarjach mogło wiązanie azotu być zahamowane niedostatkami materiałów energetycznych, gromadzących się powoli w miarę zamierania roślinności, gdyż początkowa ilość substancji organicznych, zawartych w glinie była bardzo mała. Pozatem nie wiadomo, czy i ta drobna ilość nadawała się do przeróbki przez wiążące azot mikroorganizmy.

Trudno również znaleźć właściwą ocenę podanego bilansu azotowego. Po za kwestją metodyki oznaczeń, która była traktowana jaknajskrupulatniej, zachodzi możliwość pochłaniania przez rośliny rozwijające się w akwarjach lotnych związków azotowych. Uniknięcie tego źródła błędów jest przy akwarjach otwartych wręcz niemożliwe, a postawienie kontrol, jak to ostatnio stara się — słusznie — dla hodowli bakterij wykazać M. P. L ö n i s, stwarza istotnie tylko iluzję pewności wyników, gdyż związki te ulatniają się z kontrol, a pochłaniane są przez organizmy w naczyniach zaszczipionych.

Mimo wszelkich zastrzeżeń nie widzę jednak innej drogi dla zdobycia głębszego wglądu w przebieg złożonych procesów odbywających się w wodach naturalnych, w szczególności zamkniętych, nawet w odniesieniu do procesu krążenia azotu. W toku będące rozleglejsze doświadczenie tego rodzaju może usunąć wiele wątpliwości, wyłaniających się obecnie.

STRESZCZENIE.

1. Przeprowadzono ilościowe doświadczenie z 4 akwarjami przez 487 dni.

2. Ułożono przedewszystkiem bilans azotu dla każdego akwarjum, z którego wynika, że nastąpiło wiązanie azotu wszędzie, w akwarjach z początkową dawką azotanu amonowego proces ten był słabszy, w „bezaazotowych” silniejszy.

3. Doszczepienie azotobaktera i klostridjum wzmogło wiązanie azotu.

4. Roślinność makroskopowa w akwarjach z dawką azotu rozwinęła się prędzej i bujniej.

5. Mikroskopowa roślinność w akwarjach „bezażotowych”, początkowo słaba, rozwijała się z biegiem czasu coraz obficie, ilościowo dościgając pod koniec trwania doświadczenia roślinność tą w akwarjach z azotem.

6. Związany biologicznie azot w wodach wcześniej staje się dostępnym dla planktonu niż dla roślin wyższych.

7. Ilościowo prowadzone doświadczenie akwarjowe powinno stać się dla hydrobiologa tem, czem jest doświadczenie wazonowe dla rolnika.

Zakład Fizjologii Roślin Uniw. Warsz.

L I T E R A T U R A.

1. B e n e c k e, W. u. K e u t n e r, J.: Ber. d. deutsch. bot. Ges. 1903. XXI. 333.
2. D e m o l l, R. Teichdüngung in Handbuch der Binnenfischerei Mitteleuropas. Stuttgart. 1925.
3. F i s c h e r, H e r m: Ber. d. deutsch. bot. Ges. 1917. XXXV. 423.
4. H o f e r, B.: Allg. Fisch.-Ztg. 1915, 1916, 1917.
5. L ö h n i s, M. P.: Soil Science. 1930. XXIX. 37.
6. N i k l e w s k i, Br.: Kosmos. 1910. XXXV. 66.
7. O l s e n, C.: C. r. Lab. Carlsberg. 1927. XVII. Nr. 3.
8. „ ibid. 1929. XVII. Nr. 15.
9. R u s s e l, E. J. Soil conditions and plant growth. 1921.
10. Z u n t z, C s e n s n y, W i l l e r u. W u n d s c h: Ztsch f. Fisch. N. F. IV. 1919.

R E S U M É.

1. On a exécuté des expériences quantitatives de longue durée (487 jours) ayant pour but l'établissement du bilan d'azote dans les aquariums.

2. Quatre aquariums d'une capacité de 12000 cm³ (20×25×24 cm) et d'une surface de 500 cm² furent remplis chacun de: 1 kg de l'argile de potier stérilisée, 10 litres d'eau distillée en verre, 1,0 g de K₂ HPO₄, 1,0 g de Mg SO₄, de 0,5 g Na Cl et de 2,0 g CaCO₃. On a ajouté en outre aux aquariums (N^os 1 et 2) 1 g da NH₄ NO₃ = 350 mg d'azote.

Dans chaque aquarium on introduisit: 1 ex. de *Ceratophyllum demersum* L (3,0 g de poids frais), 1 ex. de *Spirodela polyrrhiza* Schleid, 2 ex. de *Salvinia natans* All. et 3 ex. de *Lemna minor* L., 25 cm³ d'une suspension de plancton, dans lequel prédominait *Chlamydomonas* et 25 cm³ d'une suspension contenant *Daphnia pulex* Geer, *Cyclops strenuus* S. Fisch. et *Cypris fuscata* Jur. La quantité totale de substance organique introduite à chaque aquarium = 0,13 g = 3,82 g d'azote.

3. A la fin de l'expérience on a établi le bilan d'azote. L'analyse a révélé dans tous les aquariums une augmentation d'azote rixe, plus grande dans ces aquariums, qui n'ont pas reçu du nitrate d'ammonium au debut (voir Table I p. 370).

4. La plus intense fixation d'azote libre fut constatée dans l'aquarium N^o 3, qu'on a inoculé avec de cultures pures d'*Azotobacter* et de *Clostridium*.

5. Les plantes supérieures se développaient du debut beaucoup mieux dans les aquariums (N^{os} 1 et 2), contenant le nitrate d'ammonium.

6. Au contraire, la flore inférieure et surtout le plancton était plus abondante dans les aquariums (N^{os} 3 et 4) sans azote; son développement, faible au debut, devint très abondant.

7. Il s'en suivrait que l'azote fixé biologiquement devient beaucoup plus tôt accesible aux plantes inférieures qu'aux plantes supérieures.

8. De ces résultats on pourrait conclure que les expériences quantitatives avec les aquariums pourraient rendre aux hydrobiologistes les mêmes services que les expériences aux pots aux agromomes.

Institut de physiologie végétale de l'univ. de Varsovie.